

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

**2 727 428**

②1 N° d'enregistrement national : **94 14322**

⑤1 Int Cl<sup>8</sup> : C 12 N 15/49, 7/00, 5/06, C 07 H 21/00, A 61 K 31/70,  
38/16, C 12 Q 1/68, C 07 K 14/155

⑫

**DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

**A1**

②2 Date de dépôt : 24.11.94.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 31.05.96 Bulletin 96/22.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Ce dernier n'a pas été  
établi à la date de publication de la demande.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : BIO MERIEUX SOCIETE ANONYME  
— FR.

⑦2 Inventeur(s) : PERRON HERVE, MALLET  
FRANCOIS, MANDRAND BERNARD, BEDIN  
FREDERIC et BESEME FREDERIC.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : GERMAIN ET MAUREAU.

⑤4 VIRUS MSRV1 ASSOCIE A LA SCLEROSE EN PLAQUES ET SES CONSTITUANTS NUCLEIQUES.

⑤7 L'invention concerne un matériel viral qui comprend un  
acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique  
consistant en la séquence nucléotidique SEQ ID N01 ou sa  
séquence complémentaire, ou une séquence équivalente,  
notamment une séquence nucléotidique, présentant au  
moins 50% et préférentiellement au moins 70% d'homolo-  
gie avec la séquence nucléotidique SEQ ID N01 ou sa sé-  
quence complémentaire, et comprenant au moins 10 nu-  
cléotides contigus.

L'invention concerne en outre les utilisations de ce maté-  
riel viral.

FR 2 727 428 - A1



La sclérose en plaques (SEP) est une maladie démyélinisante du système nerveux central (SNC) dont la cause reste encore inconnue.

De nombreux travaux ont étayé l'hypothèse d'une  
5 étiologie virale de la maladie, mais aucun des virus  
connus testés ne s'est avéré être l'agent causal  
recherché : une revue des virus recherchés depuis des  
années dans la SEP a été faite par E. Norrby (Prog. Med.  
Virol., 1978 ; 24, 1-39) et R.T. Johnson (dans "Handbook of  
10 clinical neurology, 47 Demyelinating diseases". Vinken P.  
et Bruyn G.W., eds. Amsterdam, Elsevier Science  
Publishing, 1985, 319-336). Parallèlement, la possibilité  
d'un facteur exogène et/ou infectieux est suggérée par  
l'existence d'épidémies localisées ou "clusters" de SEP  
15 comme ce qui a été observé dans les Iles Feroes entre 1943  
et 1960 (Cook 1980), en Sardaigne (Rosati, 1988), en  
Norvège (Riisse, 1991), ainsi que par les études sur les  
migrants (Elia, 1990). Parmi tous les facteurs exogènes  
suggérés, les virus ont été étudiés le plus souvent et une  
20 étiologie virale est classiquement évoquée.

L'observation, dans la SEP, de phénomènes  
assimilables à une réaction d'auto-immunité a conduit à  
une hypothèse étiologique auto-immune "essentielle"  
(voir : Lisak R.P., Zweiman B. New Engl. J. Med. 1977 ;  
25 297, 850-853, et, Lassmann H. et Wisniewski H.M. Arch.  
Neurol. 1979 ; 36, 490-497). Cependant, cette auto-  
immunité dirigée contre certains composants du système  
nerveux central (SNC) s'est révélée peu spécifique de la  
SEP et fréquente dans les inflammations du SNC, associées  
30 ou non à une infection, ainsi que cela a été montré par  
Hirayama M. et coll. (Neurology 1986 ; 36, 276-8), Kenneth  
G. Warren et coll. (Annals of Neurology 1986 ; 20, 20-25),  
Suzumura A. et coll. (Journal of Neuroimmunology 1986 ;  
11, 137-47), et, Tourtelotte W. et coll. (Journal of  
35 Neurochemistry 1986 ; 46, 1086-93). De plus, comme l'a  
fait remarquer E.J. Field (The Lancet 1989 ; I, 1272.)

- aucune des thérapeutiques immunosuppressives n'a permis d'obtenir des résultats décisifs contre la SEP. Il semble maintenant probable que les manifestations "auto-immunes" sont induites par un mécanisme d'origine virale :
- 5 co-sensibilisation à des déterminants viraux associés à des molécules d'origine cellulaire, phénomènes de mimétisme moléculaire, comme cela a été décrit par Fujinami R.S et Oldstone M.B.A (dans "Molecular mimicry : Cross-reactivity between microbes and host proteins as a
- 10 cause of autoimmunity". Oldstone M.B.A., ed.. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 145, Berlin, Springer-Verlag, 1989) ou, selon P. Rudge (Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, 1991 54, 853-855), par expression de superantigènes rétroviraux.
- 15 Des travaux ont étayé une hypothèse selon laquelle un rétrovirus serait à l'origine de la maladie : la découverte récente par A. Gessain et coll. (J. Infect. Disease 1988 ; 1226-1234), de syndromes neurologiques associés au virus HTLV-I, connu à l'origine comme agent de
- 20 leucémies T de l'adulte, a conduit de nombreux auteurs, tels que H. Koprowski et coll. (Nature 1985 ; 318, 154), M.Ohta et coll. (J. Immunol. 1986 ; 137, 3440), E. P. Reddy et coll. (Science 1989 ; 243, 529), S.J. Greenberg et coll. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989 ; 86, 2878), J.H.
- 25 Richardson et coll. (Science 1989 ; 246, 821), S.L. Hauser et coll. (Nature 1986 ; 322, 176) et A. Karpas et coll. (Nature 1986 ; 322, 177), à rechercher une implication de ce rétrovirus humain dans la SEP, cependant sans succès ou avec des résultats évoquant des réactions croisées.
- 30 Par ailleurs, il existe un modèle animal très proche de la SEP, induit par un rétrovirus : le virus MAEDI-VISNA du mouton . Il est connu que l'infection naturelle par ce virus peut provoquer deux types de maladies chez cet animal : le Maedi, une pneumonie
- 35 interstitielle lymphocytaire qui peut survenir lors de la primo-infection par ce rétrovirus et une pathologie

neurologique démyélinisante tardive suivant généralement une phase de latence prolongée, le Visna. La physiopathologie du Visna naturel concorde avec la plupart des données cliniques et biologiques de la SEP, comme le  
5 rapportent Johnson R.T. (Rev. Infect. Dis. 1985 ; 7, 66-67), Narayan O. et Cork L.C. (Rev. Infect. Dis. 1985 ; 7, 89-98 ), et Nathanson N. et coll. (Rev. Infect. Dis. 1985 ; 7, 75-82). L'infection expérimentale des moutons par inoculation intra-ventriculaire de souches  
10 neurovirulentes du virus VISNA a permis d'établir la responsabilité de ce virus dans la genèse de cette affection démyélinisante du mouton. Comme l'expliquent Nathanson N. et coll. (Rev. Infect. Dis. 1985 ; 7, 75-82), Hoffman P.M. et Panitch H.S. (dans, "Handbook of clinical  
15 neurology, 12 : Viral diseases" R.R. Mc Kendall, ed.. Elsevier science Publishing, Amsterdam, 1989, p. 453-466), et A. Haase (Nature 1986 ; 322, 130-136), elle diffère de l'infection naturelle par ses conséquences neuropathologiques exacerbées, mais reste proche de la  
20 SEP. Il est de plus notable que, dans l'ensemble des travaux effectués sur ce sujet par les auteurs précités, notamment, le virus Visna est régulièrement retrouvé dans les cellules de plexus choroïdes du cerveau qui constituent un site de latence et de réplication  
25 occasionnelle du provirus Visna; la localisation de ces cellules à l'interface sang/liquide céphalo-rachidien (LCR) explique certainement ce phénomène.

Récemment, un rétrovirus, différent des rétrovirus humains connus a été isolé chez des patients atteints de  
30 SEP par H. Perron et coll. (Res. Virol. 1989 ; 140, 551-561/ dans : "Current concepts in multiple sclerosis" Wiethölter et coll., eds. Amsterdam, Elsevier, 1991, p. 111-116/ The Lancet 1991 ; 337, 862-863). Les auteurs ont aussi pu montrer que ce rétrovirus pouvait être  
35 transmis in vitro, que des patients atteints de SEP produisaient des anticorps susceptibles de reconnaître des

protéines associées à l'infection des cellules leptoméningées par ce rétrovirus et que l'expression de ce dernier pouvait être fortement stimulée par les gènes immédiats-précoces de certains herpesvirus (Perron et coll. Herpes simplex virus ICPO and ICP4 immediate-early proteins strongly enhance expression of a retrovirus harboured by a leptomeningeal cell-line from multiple sclerosis.1993. J. Gen. Virol. 74 ; 65-72).

Tous ces résultats plaident en faveur du rôle dans la SEP d'au moins un rétrovirus inconnu ou d'un virus ou de tout agent pathogène, ayant une activité transcriptase inverse détectable selon la méthode publiée par H. Perron et coll. (Res. Virol. 1989 ; 140, 551-561) et qualifiée d'activité "RT de type LM7".

Récemment, les travaux de la demanderesse ont permis d'obtenir deux lignées continues de cellules infectées par des isolats naturels provenant de deux patients différents atteints de SEP, par un procédé de culture tel que décrit dans la demande de brevet n° WO 93/20188. Ces deux lignées dérivées de cellules de plexus-choroïdes humains, dénommées PLI-2 et LM7PC ont été déposées à l'ECACC respectivement le 22 juillet 1992 et le 8 janvier 1993, sous les numéros 92072201 et 93010817, conformément aux dispositions du traité de Budapest. Par ailleurs, les isolats viraux possédant une activité RT de type LM7 ont également été déposés à l'ECACC sous la dénomination globale de "souches". La "souche" ou isolat hébergé par la lignée PLI-2, dénommée POL-2, a été déposée le 22 juillet 1992 sous le n° V92072202. La "souche" ou isolat hébergé par la lignée LM7PC, dénommée MS7PG, et a été déposée le 8 janvier 1993 sous le n° V93010816.

A partir des cultures et des isolats précités, caractérisés par des critères biologiques et morphologiques, on a caractérisé le matériel nucléaire associé aux particules virales produites dans ces cultures, comme décrit ultérieurement.

Ces travaux ont notamment permis d'identifier ou isoler un virus humain présentant une activité transcriptase inverse issu des souches virales précitées.

Ainsi, les objets de la présente invention sont  
5 les suivants:

- un matériel viral comprenant un acide nucléique qui comprend une séquence nucléotidique consistant en la séquence nucléotidique SEQ ID N01 ou sa séquence complémentaire, ou une séquence équivalente, notamment une  
10 séquence nucléotidique, présentant au moins 50 % et préférentiellement au moins 70 % d'homologie avec la séquence nucléotidique SEQ ID N01 ou sa séquence complémentaire, et comprenant au moins 10 nucléotides contigus,

15 - un matériel viral comprenant un acide nucléique qui comprend une séquence nucléotidique consistant en une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04 et SEQ ID N05, leurs séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes,  
20 notamment les séquences nucléotidiques d'au moins 10 nucléotides, présentant au moins 50 % et préférentiellement au moins 70 % d'homologie avec l'une quelconque des séquences nucléotidiques choisies parmi SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04 et SEQ ID N05 et leurs  
25 séquences complémentaires,

- un virus humain à l'état substantiellement isolé, possédant une activité transcriptase inverse, apparenté à une famille d'éléments rétroviraux endogènes et associé à la sclérose en plaques, issu d'une souche  
30 virale possédant une activité transcriptase inverse, choisie parmi les souches virales dénommées respectivement POL-2, déposée le 22.07.1992 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V92072202, et MS7PG déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V93010816, et des  
35 souches variantes consistant en des virus comprenant au moins un antigène qui est reconnu par au moins un

anticorps dirigé contre au moins un antigène correspondant de l'un ou l'autre des virus des souches virales POL-2 et MS7PG précitées,

- un virus humain à l'état substantiellement isolé, possédant une activité transcriptase inverse, apparenté à une famille d'éléments rétroviraux endogènes, et associé à la sclérose en plaques, produit par une lignée cellulaire choisie parmi les lignées cellulaires dénommées respectivement PLI-2 déposée le 22.07.1992  
auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 92072201 et LM7PC  
déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC sous le numéro  
d'accès 93010817, et toutes les cultures cellulaires infectées susceptibles de produire un virus comprenant au moins un antigène qui est reconnu par au moins un  
anticorps dirigé contre au moins un antigène correspondant de l'un ou l'autre des virus produits par les lignées PLI-2 et LM7PC précitées,

- un matériel rétroviral humain, associé à la sclérose en plaques, comprenant un acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique d'au moins 10 nucléotides, présentant au moins 50 % d'homologie avec une séquence nucléotidique appartenant au gène *pol* du génome du rétrovirus dénommé ERV-9 ou HSERV-9,

- un matériel rétroviral humain associé à la sclérose en plaques, comprenant un acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique codant pour une séquence peptidique d'au moins 10 acides aminés, présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence peptidique codée par le gène *pol* du génome du rétrovirus ERV-9 ou HSERV-9,

- un matériel rétroviral humain, associé à la sclérose en plaques, comprenant un acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique codant pour une séquence peptidique d'au moins 10 acides aminés, présentant au moins 50 % et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence peptidique codée par la



séquence nucléotidique SEQ ID N01, ou sa séquence complémentaire,

5 - un matériel rétroviral humain, associé à la sclérose en plaques, comprenant un acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique codant pour une séquence peptidique d'au moins 10 acides aminés, présentant au moins 50 % et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence peptidique codée par l'une quelconque des séquences nucléotidiques choisies parmi SEQ  
10 ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04 et SEQ ID N05, leurs séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes,

15 - l'association du virus ou matériel viral humain décrit ci-dessus avec un virus ou un agent pathogène dont le génome comprend une séquence nucléotidique d'au moins 10 nucléotides, présentant au moins 50 % et de préférence au moins 70 % d'homologie avec la séquence nucléotidique SEQ ID N06 ou sa séquence complémentaire,

20 - une lignée cellulaire déposée le 08.01.1993, auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 93010817.

- une souche virale déposée le 08.01.1993, auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V93010816,

25 - un fragment nucléotidique comprenant une séquence nucléotidique consistant en SEQ ID N01 ou sa séquence complémentaire, ou une séquence équivalente, notamment une séquence nucléotidique, présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec la séquence nucléotidique SEQ ID N01 ou sa séquence complémentaire.

30 - un fragment nucléotidique consistant en une séquence nucléotidique identique à SEQ ID N01 ou sa séquence complémentaire, ou une séquence équivalente, notamment une séquence nucléotidique, présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec la  
35 séquence nucléotidique SEQ ID N01 ou sa séquence complémentaire,

- un fragment nucléotidique comprenant une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04 et SEQ ID N05, leurs séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes, 5 notamment leurs séquences nucléotidiques d'au moins 10 nucléotides, présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec l'une quelconque des séquences nucléotidiques choisies parmi SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04 et SEQ ID N05, et leurs séquences 10 complémentaires,

- un fragment nucléotidique dont la séquence nucléotidique est identique à une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04 et SEQ ID N05, leurs séquences complémentaires, et leurs 15 séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques, présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec l'une quelconque des séquences nucléotidiques choisies parmi SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04 et SEQ ID N05 et leurs séquences 20 complémentaires,

- un ARN ou ADN et notamment vecteur de répllication, comprenant un fragment nucléotidique tel que décrit précédemment,

- une amorce spécifique pour l'amplification par 25 polymérisation d'un ARN ou d'un ADN d'un virus associé à la sclérose en plaques, ladite amorce comprenant une séquence nucléotidique identique à au moins une partie d'un fragment de l'invention ou équivalente, notamment une séquence nucléotidique présentant au moins 50%, et de 30 préférence au moins 70 % d'homologie avec au moins une partie dudit fragment; une amorce préférentielle a au moins 10 nucléotides,

- une sonde susceptible de s'hybrider spécifiquement avec un ARN ou un ADN d'un virus associé à 35 la sclérose en plaques, comprenant une séquence nucléotidique identique ou équivalente à au moins une

partie d'un fragment de l'invention, notamment une séquence nucléotidique présentant au moins 50%, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec au moins une partie dudit fragment,

5           - une utilisation d'une sonde ou d'une amorce de l'invention, pour détecter et/ou identifier, dans un échantillon biologique, un virus associé à la sclérose en plaques,

          - une composition thérapeutique antisens, 10 notamment pour le traitement de la sclérose en plaques, comprenant au moins la séquence nucléotidique identique ou équivalente à au moins une partie d'un fragment de l'invention, notamment une séquence nucléotidique présentant au moins 50%, et de préférence au moins 70 % 15 d'homologie avec au moins une partie dudit fragment,

          - un procédé pour détecter et/ou identifier un virus associé à la sclérose en plaques, dans un échantillon biologique, consistant à exposer un ARN et/ou un ADN spécifique audit virus, et/ou leur ADN et/ou ARN 20 complémentaires, à au moins une sonde de l'invention; préférentiellement, avant d'exposer l'ARN et/ou l'ADN ou leur ADN et/ou ARN complémentaires, à la sonde, on hybride ledit ARN et/ou ledit ADN avec au moins une amorce de l'invention et on amplifie ledit ARN et/ou ADN,

25           - un procédé pour quantifier, dans un échantillon biologique, l'expression d'un virus associé à la sclérose en plaques, consistant à exposer un ARN et/ou un ADN spécifique audit virus et/ou leur ADN et/ou ARN complémentaires, à au moins une sonde de l'invention,

30           - un peptide à l'état substantiellement isolé, codé par la séquence nucléotidique du génome d'un virus associé à la sclérose en plaques, et codé par au moins une partie d'un fragment nucléotidique de l'invention,

          - une protéine comprenant un peptide de 35 l'invention,

- un oligopeptide comprenant au moins cinq aminoacides contigus d'un peptide de l'invention,
- une composition diagnostique, et/ou thérapeutique et/ou prophylactique, comprenant au moins un peptide, ou au moins une protéine ou au moins un oligopeptide de l'invention,
- une composition diagnostique, et/ou thérapeutique, et/ou vaccinale, et/ou prophylactique, comprenant un ligand spécifique d'au moins un peptide, ou d'au moins une protéine, ou d'au moins un oligopeptide de l'invention, tels que décrits précédemment.

Les objets de l'invention définis ci-dessus permettent notamment la préparation de tests diagnostiques et de vaccins, et sont notamment utiles dans des procédés d'essai d'agents anti-viraux à usage pharmacologique, dans des procédés de diagnostic ou de thérapie génique.

Avant de détailler l'invention, différents termes utilisés dans la description et les revendications sont à présent définis :

- par matériel viral ou rétroviral selon l'invention, on entend tout ou fraction d'un virus ou rétrovirus extrait, séparé, ou substantiellement isolé, par l'intervention de la main de l'homme, notamment par culture d'un échantillon prélevé dans son milieu naturel,
- le terme "MSRV" utilisé dans la présente description désigne toute espèce virale associée à la sclérose en plaques, les souches atténuées de ladite espèce, ou les particules défectives interférentes dérivées de cette espèce. Il est connu que les virus et particulièrement les virus contenant de l'ARN ont des taux relativement élevés de mutation spontanée (Fields and Knipe (1986) Fundamental Virology (Rev Press N.Y.)), dont il sera tenu compte ci-après pour définir la notion d'équivalence,
- par virus humain, on entend un virus susceptible d'infecter l'être humain,

- compte tenu de toutes ces variations, les objets de la présente invention définis ci-dessus ont été exprimés en tenant compte des équivalents ou dérivés, notamment des séquences homologues nucléotidiques ou peptidiques,

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
- selon l'invention, un fragment nucléotidique ou un oligonucléotide est un enchaînement de monomères, caractérisé par la séquence informationnelle des acides nucléiques naturels, susceptibles de s'hybrider à tout fragment nucléotidique dans des conditions prédéterminées, l'enchaînement pouvant contenir des monomères de structures différentes et être obtenu à partir d'une molécule d'acide nucléique naturelle et/ou par recombinaison génétique et/ou par synthèse chimique,

15  
20  
25  
30  
35  
- ainsi un monomère peut être un nucléotide naturel d'acide nucléique dont les éléments constitutifs sont un sucre, un groupement phosphate et une base azotée; dans l'ARN le sucre est le ribose, dans l'ADN le sucre est le désoxy-2-ribose; selon qu'il s'agit de l'ADN ou l'ARN, la base azotée est choisie parmi l'adénine, la guanine, l'uracile, la cytosine, la thymine; ou un nucléotide modifié dans l'un au moins des trois éléments constitutifs ; à titre d'exemple, la modification peut intervenir au niveau des bases, générant des bases modifiées telles que l'inosine, la méthyl-5-désoxycytidine, la désoxyuridine, la diméthylamino-5-désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5-désoxyuridine et toute autre base modifiée favorisant l'hybridation, au niveau du sucre, à savoir le remplacement d'au moins un désoxyribose par un polyamide (P.E. Nielsen et al, Science, 254, 1497-1500 (1991)), au niveau du groupement phosphate par exemple son remplacement par des esters notamment choisis parmi les esters de diphosphate, d'alkyl et arylphosphonate et de phosphorothioate,

- par "séquence informationnelle", on entend toute suite ordonnée de monomères, dont la nature chimique et l'ordre dans un sens de référence constituent une information de même qualité que celle des acides  
5 nucléiques naturels,

- par hybridation, on entend le processus au cours duquel, dans des conditions appropriées, deux fragments nucléotidiques, ayant des séquences suffisamment complémentaires, s'apparient pour former un brin multiple,

10 - une sonde est un fragment nucléotidique comprenant au moins dix monomères, avantageusement de 10 à 50 monomères, possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées. Une sonde peut être utilisée à des fins de diagnostic telles que les sondes de capture  
15 et/ou de détection, ou à des fins de thérapie,

- la sonde de capture peut être immobilisée sur un support solide par tout moyen approprié, c'est-à-dire directement ou indirectement, par exemple par covalence ou adsorption passive,

20 - la sonde de détection est marquée au moyen d'un marqueur choisi notamment parmi les isotopes radioactifs, des enzymes notamment choisis parmi la peroxydase et la phosphatase alcaline et ceux susceptibles d'hydrolyser un substrat chromogène, fluorigène ou luminescent, des  
25 composés chimiques chromophores, des composés chromogènes, fluorigènes ou luminescents, des analogues de bases nucléotidiques, et la biotine,

- les sondes utilisées à des fins de diagnostic de l'invention peuvent être mises en oeuvre dans toutes les  
30 techniques d'hybridation connues et notamment les techniques dites "DOT-BLOT" (MANIATIS et al, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1982), "SOUTHERN BLOT" [SOUTHERN. E.M., J. Mol. Biol., 98, 503 (1975), "NORTHERN BLOT" qui est une technique identique à la technique  
35 "SOUTHERN BLOT" mais qui utilise de l'ARN comme cible, la technique SANDWICH (DUNN A.R., HASSEL J.A., Cell, 12, 23

(1977)] ; avantageusement, on utilise la technique SANDWICH dans la présente invention, comprenant une sonde de capture spécifique et/ou une sonde de détection spécifique, étant entendu que la sonde de capture et la sonde de détection doivent présenter une séquence nucléotidique au moins partiellement différente,

- une autre application de l'invention est une sonde de thérapie, ladite sonde étant susceptible de s'hybrider in vivo sur l'ARN et/ou sur l'ADN pour bloquer les phénomènes de traduction et/ou de transcription, et/ou pour dégrader ledit ADN et/ou ARN,

- une amorce est une sonde comprenant de 10 à 30 monomères, possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour l'initiation d'une polymérisation enzymatique par exemple dans une technique d'amplification telle que la PCR (Polymerase Chain Reaction), dans un procédé d'élongation, tel que le séquençage, dans une méthode de transcription inverse ou analogue,

- deux séquences nucléotidiques ou peptidiques sont dites équivalentes, si fonctionnellement elles jouent le même rôle, vis-à-vis de l'application considérée, ou dans la technique dans laquelle elles interviennent; deux séquences équivalentes ou leurs compléments sont susceptibles de s'hybrider l'une sur l'autre; sont notamment équivalentes deux séquences obtenues par variation naturelle ou non de l'une par rapport à l'autre, ainsi que de séquences homologues, l'homologie étant définie ci-après,

- par variabilité, on entend toute modification, spontanée ou non d'une séquence, notamment par substitution, et/ou insertion, et/ou délétion de nucléotides et/ou des fragments nucléotidiques; une variabilité non naturelle peut résulter des techniques de génie génétique utilisées, par exemple du choix des amorces de synthèse dégénérées ou non, retenues pour

amplifier un acide nucléique; cette variabilité peut se traduire par des modifications de toute séquence de départ, considérée comme référence, et pouvant être exprimée par un degré d'homologie par rapport à ladite  
5 séquence de référence,

- l'homologie caractérise le degré de similitude de deux fragments nucléotidiques ou peptidiques comparés; elle est appréciée par le degré d'homologie qui est notamment déterminé par comparaison directe de séquences  
10 nucléotidiques ou peptidiques obtenues à des séquences nucléotidiques ou peptidiques de référence,

- par peptide, oligopeptide ou protéine, on entend notamment tout peptide, oligopeptide ou protéine extrait, séparé, ou substantiellement isolé, par l'intervention de  
15 la main de l'homme, notamment ceux obtenus par synthèse chimique, ou par expression dans un organisme recombinant,

- un acide aminé est dit homologue d'un autre acide aminé, lorsque leur caractéristiques physico-chimiques, telles que polarité, hydrophobicité, et/ou  
20 basicité, et/ou acidité, et/ou neutralité, sont sensiblement les mêmes; ainsi, une leucine est homologue d'une isoleucine.

Etant donné qu'un virus possédant une activité enzymatique transcriptase inverse peut être génétiquement  
25 caractérisé aussi bien sous forme d'ARN que d'ADN, il sera fait mention aussi bien de l'ADN que de l'ARN viral pour caractériser les séquences relatives à un virus possédant une telle activité transcriptase inverse.

L'invention sera mieux comprise à la lecture de la  
30 description détaillée qui va suivre faite en référence aux figures 1 à 9 annexées, dans lesquelles :

- la figure 1 illustre la disposition relative des différents clones F11-1, MSRV-1B, M003-P004 et PSJ17 séquencés dans la région pol du virus MSRV-1,

35 - la figure 2 représente la séquence nucléotidique SEQ ID N01, et une trame fonctionnelle de lecture possible



en acides aminés de SEQ ID N01; sur cette séquence nucléotidique, les séquences consensus des transcriptases inverses rétrovirales sont soulignées,

- les figure 3, 4, 5, 6 représentent les séquences  
5 nucléotidiques respectivement SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04, et SEQ ID N05, des clones dénommés respectivement F11-1, MSRV-1, M003-P004, et PSJ17; sur la figure 3 représentant SEQ ID N02, la partie signalée dans la région de l'amorce correspond à une variabilité imposée par le  
10 choix de l'amorce ayant servi au clonage de F11-1; sur cette même figure, la traduction en acides aminés de SEQ ID N02 est représentée,

- la figure 7 est une représentation matricielle de l'homologie entre SEQ ID N02 du clone F11-1, et celle  
15 d'un rétrovirus endogène connu, dénommé ERV9 ou HSERV9, cette homologie étant mise en évidence par un trait plein, et la divergence significative par l'absence de trait,

- la figure 8 est une représentation matricielle de la comparaison de SEQ ID N01 de MSRV-1, avec celle du  
20 rétrovirus endogène ERV9 ou HSERV9 à une échelle différente de la représentation donnée à la figure 7,

- la figure 9 représente la séquence nucléotidique SEQ ID N06.

25 **EXEMPLE 1: OBTENTION DE CLONES, DEFINISSANT UNE FAMILLE MSRV-1B, PAR AMPLIFICATION PCR "NICHEE" DES REGIONS POL CONSERVEES DES RETROVIRUS SUR DES PREPARATIONS DE VIRIONS ISSUES DES LIGNEES LM7 ET PLI-2.**

Une technique PCR dérivée de la technique publiée par Shih  
30 et coll. a été utilisée. Cette technique permet, par traitement de tous les composants du milieu réactionnel par la DNase, d'éliminer toute trace d'ADN contaminant. Elle permet parallèlement, par l'utilisation d'amorces différentes mais chevauchantes dans deux séries  
35 successives de cycles d'amplifications PCR, d'augmenter les chances d'amplifier un ADNc résultant d'une quantité

d'ARN faible au départ et encore réduite dans l'échantillon par l'action parasite de la DNase sur l'ARN; ce, d'autant plus la DNase est utilisée dans des conditions d'activité en excès qui permettent d'éliminer toute trace d'ADN contaminant avant inactivation de cette enzyme restant dans l'échantillon par chauffage à 85°C pendant 10 minutes. Cette variante de la technique PCR décrite par Shih et coll, a été utilisée sur des fractions de virions, purifiés comme précédemment pour les surnageants congelés des cultures LM7, issus cette fois de lignée lymphoblastoïde B spontanée provenant d'un nouveau cas de SEP, de la culture PLI-2 (ECACC n° 92072201) et de la culture LM7PC (ECACC n°93010817), ces deux dernières cultures ayant été obtenues selon les méthodes ayant fait l'objet du brevet n° WO 93/20188.

Les produits issus de la PCR et de la RT-PCR ont été purifiés après purification sur gel d'agarose selon les méthodes conventionnelles (Sambrook J., Fritsch E.F., et Maniatis T., Molecular cloning, a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press, 1989), puis resuspendu dans 10ml d'eau distillée. Une des propriétés de la polymérase Taq consistant à ajouter une adénine à l'extrémité 3' de chacun des deux brins d'ADN, l'ADN obtenu a été directement inséré dans un plasmide à l'aide du kit TA Cloning<sup>TM</sup> (British Biotechnology). Les 2µl de solution d'ADN ont été mélangés avec 5µl d'eau distillée stérile, 1µl d'un tampon de ligation 10 fois concentré "10X LIGATION BUFFER", 2µl de "pCR<sup>TM</sup> VECTOR" (25 ng/ml) et 1µl de "TA DNA LIGASE". Ce mélange a été incubé une nuit à 12°C. Les étapes suivantes ont été réalisées conformément aux instructions du kit TA Cloning<sup>®</sup> (British Biotechnology). A la fin de la procédure, les colonies blanches de bactéries recombinantes (white) ont été repiquées pour être cultivées et permettre l'extraction des plasmides incorporés selon la procédure dite de "miniprep" (Sambrook J., Fritsch E.F., et Maniatis T.,

Molecular cloning, a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press, 1989). La préparation de plasmide de chaque colonie recombinante a été coupée par une enzyme de restriction appropriée et analysée sur gel d'agarose. Les  
5 plasmides possédant un insert détecté sous lumière UV après marquage du gel au bromure d'éthidium, ont été sélectionnés pour le séquençage de l'insert, après hybridation avec une amorce complémentaire du promoteur Sp6 présent sur le plasmide de clonage du TA Cloning Kit.  
10 La réaction préalable au séquençage a ensuite été effectuée selon la méthode préconisée pour l'utilisation du kit de séquençage "Prism ready reaction kit dye deoxyterminator cycle sequencing kit" (Applied Biosystems, ref. 401384) et le séquençage automatique a été réalisé  
15 avec l'appareil "automatic sequencer", modèle 373 A Applied Biosystems selon les instructions du fabricant.

Cette technique a d'abord été appliquée à deux fractions de virions purifiés comme décrit ci-après, sur saccharose à partir de l'isolat "POL-2" produit par la  
20 lignée PLI-2 d'une part, et à partir de l'isolat MS7PG produit par la lignée LM7PC d'autre part: les surnageants de cultures sont collectés deux fois par semaine, pré-centrifugés à 10 000 tr/min pendant 30 minutes pour éliminer les débris cellulaires, et ensuite congelés à  
25 -80°C ou utilisés tels que pour les étapes suivantes. Les surnageants frais ou décongelés sont centrifugés sur un coussin de PBS-glycérol 30% à 100 000g (ou 30 000 tr/min dans un rotor LKB-HITACHI de type 45 T) pendant 2h à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot sédimenté est  
30 repris dans un petit volume de PBS et constitue la fraction de virions concentrés, mais non purifiés. Le virus concentré est ensuite déposé sur un gradient de sucrose dans un tampon PBS stérile (15 à 50% poids/poids) et ultracentrifugé à 35 000 tr/min (100 000g) pendant 12 h  
35 à +4°C dans un rotor à godets. 10 fractions sont recueillies et 20µl sont prélevés dans chaque fraction

après homogénéisation pour y doser l'activité transcriptase inverse selon la technique décrite par H. Perron et coll. (Res. Virol. 1989; 140, 551-561). Les fractions contenant le pic d'activité RT de type LM7 sont  
5 ensuite diluées dans du tampon PBS stérile et ultracentrifugées une heure à 35 000 tr/min (1000 000 g) pour sédimenter les particules virales. Le culot de virions purifiés ainsi obtenu est alors repris dans un petit volume d'un tampon adéquat pour l'utilisation  
10 ultérieure qui en sera faite (Ex. Tampon Guanidium Thiocyanate pour l'extraction des ARN; PBS stérile pour le stockage à -80°C).

Les séquences clonées et séquencées à partir de  
15 ces deux échantillons ont été analysées à l'aide du logiciel Geneworks®, sur la dernière version (n° 79, novembre 93) à ce jour de la banque de données Genbank®. Elles correspondent à quatre catégories. Une première catégorie de séquence (type 1), correspond à des séquences  
20 amplifiées à partir de matériel nucléaire rétroviral contaminant la transcriptase inverse du MoMuLV utilisée pour l'étape de synthèse de l'ADN complémentaire, ainsi que cela a déjà été signalé précédemment. La deuxième catégorie (type 2), retrouvée dans la majorité des clones  
25 (55% des clones issus des isolats POL-2 des culture PLI-2, et, 67% des clones issus des isolats MS7PG des cultures LM7PC) correspond à une famille de séquences "pol" proches mais différentes du rétrovirus endogène humain dénommé ERV-9 ou HSERV-9.

30 La quatrième catégorie correspond à diverses séquences trouvées généralement en un exemplaire, ainsi qu'une de type rétroviral endogène, cependant jamais retrouvées par d'autres approches ou dans d'autres échantillons provenant de culture exprimant une activité  
35 transcriptase inverse de type LM7.

La deuxième catégorie de séquences représentant la majorité des clones est constituée de séquences dont la variabilité permet de définir quatre sous-familles de séquences. Ces sous-familles sont suffisamment proches  
5 entre elles pour qu'on puisse les considérer comme des quasi-espèces provenant d'un même rétrovirus, tel que cela est bien connu pour le rétrovirus HIV-1 par exemple (Meyerhans et al., Cell 1989; 58, 901-910), ou comme le  
10 résultat de l'expression de plusieurs provirus endogènes co-régulés dans les cellules productrices, puisqu'appartenant à la même famille de rétrovirus endogène et donc sensibles aux mêmes signaux de régulation générés éventuellement par le provirus répliquatif (Linial M.L. and Miller A.D. dans  
15 "Current topics in microbiology and immunobiology. Retroviruses, strategies of replication" vol. 157, p. 125-152; Swanstrom R. et Vogt P.K. éditeurs, Springer-Verlag, Heidelberg 1990). Cette nouvelle famille de rétrovirus endogènes ou, alternativement, cette nouvelle espèce rétrovirale dont la génération de quasi-espèces a été  
20 obtenue en culture, et qui contient un consensus des séquences décrites à la suite est dénommée MSRV-1B.

Les séquences des différents clones MSRV-1B séquencés lors de cette expérience, présentent une  
25 homologie en acides nucléiques allant de 70% à 88% avec la séquence HSERV9 référencée X57147 et M37638 dans la base de données Genbank. A partir des familles de séquences qui ont été retrouvées de manière prépondérante dans des expériences similaires répétées ultérieurement, dans les  
30 échantillons d'ARN pur de virions purifiés avec les isolats MS7PG et POL-2, quatre séquences nucléiques "consensus" représentatives de différentes quasi-espèces d'un rétrovirus MSRV-1B éventuellement exogène ou de différentes sous-familles d'un rétrovirus endogène MSRV-  
35 1B, ont été définies. Un alignement de ces consensus A, B,

C, D, représentatifs et d'un consensus général est présenté dans la figure 4.

**EXEMPLE 2: AMPLIFICATION ET CLONAGE D'UNE PORTION  
5 DU GENOME RETROVIRAL MSRV-1 A L'AIDE D'UNE SEQUENCE DEJA  
IDENTIFIEE, DANS UN ECHANTILLON DE VIRUS PURIFIE AU PIC  
D'ACTIVITE TRANSCRIPTASE INVERSE.**

Une technique PCR dérivée de la technique publiée  
10 par Frohman et coll. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 85,  
8998-9002) a été utilisée. La technique dérivée permet, à  
l'aide d'une amorce spécifique en 3' du génome à  
amplifier, d'élonguer la séquence vers la région 5' du  
génome à analyser. Cette variante technique est décrite  
15 dans la documentation de la firme "Clontech Laboratories  
Inc., (Palo-Alto California, USA) produite avec son  
produit "5'-ampliFINDER™ RACE Kit", qui a été utilisée sur  
une fraction de virion purifié comme décrit précédemment.

Les amorces 3' spécifiques utilisées dans le  
20 protocole du kit pour la synthèse de ADNc et  
l'amplification PCR sont définies par les séquences MSRV-1  
suivantes :

ADNc : TCATCCATGTACCGAAGG

amplification : ATGGGGTTCCCAAGTTCCT (SEQ ID N07)

25

Les produits issus de la PCR ont été purifiés  
après purification sur gel d'agarose selon les méthodes  
conventionnelles (Sambrook J., Fritsch E.F., et Maniatis  
T., Molecular cloning, a laboratory manual. Cold spring  
30 harbor laboratory press, 1989), puis resuspendu dans 10ml  
d'eau distillée. Une des propriétés de la polymérase Taq  
consistant à ajouter une adénine à l'extrémité 3' de  
chacun des deux brins d'ADN, l'ADN obtenu a été  
directement inséré dans un plasmide à l'aide du kit TA  
35 Cloning™ (British Biotechnology). Les 2µl de solution  
d'ADN ont été mélangés avec 5µl d'eau distillée stérile,

1  $\mu$ l d'un tampon de ligation 10 fois concentré "10X  
LIGATION BUFFER", 2  $\mu$ l de "pCR™ VECTOR" (25 ng/ml) et 1  $\mu$ l  
de "TA DNA LIGASE". Ce mélange a été incubé une nuit à  
12°C. Les étapes suivantes ont été réalisées conformément  
5 aux instructions du kit TA Cloning® (Bristish  
Biochnology). A la fin de la procédure, les colonies  
blanches de bactéries recombinantes (white) ont été  
repiquées pour être cultivées et permettre l'extraction  
des plasmides incorporés selon la procédure dite de  
10 "miniprep" (Sambrook J., Fritsch E.F., et Maniatis T.,  
Molecular cloning, a laboratory manual. Cold spring harbor  
laboratory press, 1989). La préparation de plasmide de  
chaque colonie recombinante a été coupée par une enzyme de  
restriction appropriée et analysée sur gel d'aragose. Les  
15 plasmides possédant un insert détecté sous lumière UV  
après marquage du gel au bromure d'éthidium, ont été  
sélectionné pour le séquençage de l'insert, après  
hybridation avec une amorce complémentaire du promoteur  
Sp6 présent sur le plasmide de clonage du TA cloning kit.  
20 La réaction préalable au séquençage a ensuite été  
effectuée selon la méthode préconisée pour l'utilisation  
du kit de séquençage "Prism ready reaction kit dye  
deoxyterminator cycle sequencing kit" (Applied Biosystems,  
ref. 401384) et le séquençage automatique a été réalisé  
25 avec l'appareil "automatic sequencer, modèle 373 A Applied  
Biosystems selon les instructions du fabricant.

Cette technique a d'abord été appliquée à deux  
fractions de virions purifiés comme décrit ci-après, sur  
saccharose à partir de l'isolat "POL-2" produit par la  
30 lignée PLI-2 d'une part, et à partir de l'isolat MS7PG  
produit par la lignée LM7PC d'autre part: les surnageant  
de cultures sont collectés deux fois par semaine, pré-  
centrifugés à 10000 trs/min pendant 30 minutes pour  
éliminer les débris cellulaires, et ensuite congelés à -  
35 80°C ou utilisés tels que pour les étapes suivantes. Les  
surnageants frais ou décongelés sont centrifugés sur un

coussin de PSB-glycérol 30% à 100000g (ou 30000 trs/min dans un rotor LKB-HITACHI de type 45 T) pendant 2h à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot sédimenté est repris dans un petit volume de PBS et constitue la

5 fraction de virions concentrés, mais non purifiés. Le virus concentré est ensuite déposé sur un gradient de sucrose dans un tampon PBS stérile (15 à 50% poids/poids) et ultracentrifugé à 35000 trs/min (100000g) pendant 12h à +4°C dans un rotor à godets. 10 fractions sont recueillies

10 et 20µl sont prélevés dans chaque fraction après homogénéisation pour y doser l'activité transcriptase inverse selon la technique décrite par H. Perron et coll. (Res. Virol. 1989; 140, 551-561). Les fractions contenant le pic d'activité RT de type LM7 sont ensuite diluées dans

15 du tampon PBS stérile et ultracentrifugées une heure à 35000 trs/min (100000g) pour sédimenter les particules virales. Le culot de virions purifiés ainsi obtenu est alors repris dans un petit volume d'un tampon adéquat pour l'extraction d'ARN. La réaction de synthèse d'ADN

20 mentionnée plus haut est réalisée sur cet ARN extrait de virion extracellulaire purifié.

**EXEMPLE 3: Amplification PCR des la séquence nucléique contenue entre la région 5' définie par le clone**

25 **"pol MSRV-1B" et la région 3' définie par le clone PSJ17 (MSRV-1A).**

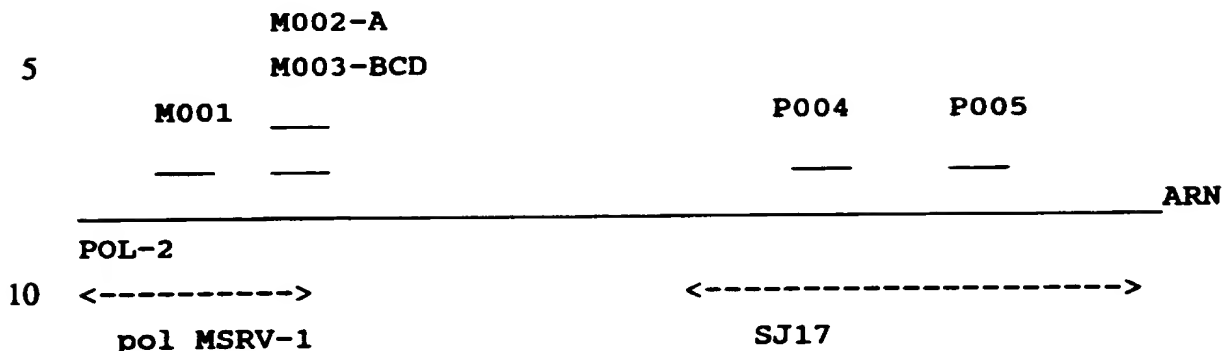
Cinq oligonucléotides, M001, M002-A, M003-BCD, P004 et P005, ont été définis pour amplifier de l'ARN

30 provenant de virions purifiés POL-2. Des réactions de contrôle ont été effectuées de manière à contrôler la présence de contaminants (réaction sur de l'eau). L'amplification consiste en une étape de RT-PCR suivie d'une PCR "nichée". Dans le premier cycle RT-PCR, les

35 amorces M001 et P004 ou P005 sont utilisées. Dans le deuxième cycle PCR, les amorces M002-A ou M003-BCD, et



l'amorce P004 sont utilisées. Les amorces sont positionnées comme suit:



Leur composition est:

amorce M001: GGTCITICCAIGG

15 amorce M002-A: TTAGGGATAGCCCTCATCTCT

amorce M003-BCD: TCAGGGATAGCCCCCATCTAT

amorce P004: AACCTTTGCCACTACATCAATTT

amorce P005: GCGTAAGGACTCCTAGAGCTATT

20 La séquence nucléotidique du produit d'amplification "nichée" décrit ci-dessus et nommé M003-P004 est présenté dans la figure 5.

EXEMPLE 4 : OBTENTION D'UN CLONE PSJ17, 25 DEFINISSANT UNE FAMILLE MSRV-1A, PAR REACTION DE TRANSCRIPTASE INVERSE ENDOGENE SUR UNE PREPARATION DE VIRION ISSUE DE LA LIGNEE PLI-2.

Cette approche vise à obtenir des séquences d'ADN rétrotranscrites à partir de l'ARN supposé rétroviral dans 30 l'isolat en utilisant l'activité transcriptase inverse présente dans ce même isolat. Cette activité transcriptase inverse ne peut théoriquement fonctionner qu'en présence d'un ARN rétroviral, lié à un ARNt amorce ou hybridé à des brins courts d'ADN déjà rétro-transcrits dans les 35 particules rétrovirales (Lori F. et coll. J. Virol. 1992 ; 66, 5067-5074). Ainsi l'obtention de séquences

rétrovirales spécifiques dans un matériel contaminé par des acides nucléiques cellulaires, était optimisée grâce à l'amplification enzymatique spécifique des portions d'ARN viraux par une activité transcriptase inverse virale. Les auteurs ont, pour cela, déterminé les conditions physico-chimiques particulières dans lesquelles cette activité enzymatique de transcription inverse sur des ARN contenus dans des virions pouvait être effective in vitro; ceux-ci correspondent à la description technique des protocoles présentés ci-dessous (réaction de RT endogène, purification, clonage et séquençage).

- Préparation de virion concentré à partir de surnageants de culture de la lignée PLI-2 :

L'approche moléculaire a consisté à utiliser une préparation de virion concentré, mais non purifié, obtenu à partir des surnageants de culture de la lignée PLI-2 préparé selon la méthode suivante : les surnageants de cultures sont collectés deux fois par semaine, pré-centrifugés à 10 000 trs/min pendant 30 minutes pour éliminer les débris cellulaires, et ensuite congelés à -80°C ou utilisés tels que pour les étapes suivantes. Les surnageants frais ou décongelés sont centrifugés sur un coussin de PBS-glycérol 30 % à 100 000g (ou 30 000 trs/min dans un rotor LKB-HITACHI de type 45 T) pendant 2 h à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot sédimenté est repris dans un petit volume de PBS et constitue la fraction de virions concentrés, mais non purifiés. Cet échantillon viral concentré mais non purifié a été utilisé pour effectuer une réaction dite de transcription inverse endogène, telle que décrite ci-après.

- Réaction de transcriptase inverse endogène :

Un volume de 200µl de virions purifiés selon le protocole décrit ci-dessus et contenant une activité transcriptase inverse d'environ 1-5 million de DPM (désintégrations par minute) est décongelé à 37°C jusqu'à apparition d'une phase liquide, puis placé sur de la glace. Un tampon 5

fois concentré a été préparé avec les composants suivants : Tris-HCl pH 8.2, 500 mM; NaCl 75 mM; MgCl<sub>2</sub> 25 mM; DTT 75 mM et NP 40 0.10 %. A 100 µl de ce tampon ont été ajoutés : 25 µl d'une solution de dATP 100 mM, 25 µl  
5 d'une solution de dTTP 100 mM, 25 µl d'une solution de dGTP 100 mM, 25 µl d'une solution de dCTP 100 mM, 100 µl d'eau distillée stérile et 200 µl de la suspension de virions (activité transcriptase inverse de 5 millions de DPM) dans le PBS ont été mélangés et incubés à 42°C  
10 pendant 3 heures. Après cette incubation le mélange réactionnel est directement mélangé avec un mélange tamponné phénol/chloroforme/alcool isoamylique (Sigma ref. P 3803), la phase aqueuse est collectée et un volume d'eau distillée stérile est ajouté à la phase organique pour ré-  
15 extraire le matériel nucléaire résiduel. Les phases aqueuses collectées sont regroupées et les acides nucléiques contenus sont précipités par addition d'acétate de sodium 3M pH 5,2 au 1/10 de volume + 2 volumes d'éthanol + 1 µl de glycogène (Boehringer-Mannheim ref.  
20 901 393) et mise à -20°C de l'échantillon pendant 4 h ou la nuit à +4°C. Le précipité obtenu après centrifugation est ensuite lavé avec de l'éthanol à 70 % et resuspendu dans 60 ml d'eau distillée. Les produits de cette réaction ont ensuite été purifiés, clonés et séquencés selon les  
25 protocole décrit ci-après.

- Clonage et séquençage des fragments d'ADN recueillis :

Des ADN bouts francs avec des adénines non-appariées aux extrémités ont été générés : une réaction de  
30 "remplissage" a d'abord été effectuée : 25 µl de la solution d'ADN précédemment purifiée ont été mélangés avec : 2 µl d'une solution 2,5 mM contenant, en quantité équimolaire, dATP + dGTP + dTTP + dCTP / 1 µl d'ADN  
polymerase T4 (Boehringer-Mannheim ref. 1004 786) / 5 µl  
35 de 10X "incubation buffer for restriction enzyme" (Boehringer-Mannheim ref. 1417 975) / 1 µl d'une solution

à 1 % de sérum-albumine bovine / 16 µl d'eau distillée stérile. Ce mélange a été incubé 20 minutes à 11°C. 50 µl de tampon TE ( Tris-EDTA) et 1µl de glycogène (Boehringer-Mannheim ref. 901 393) y ont été ajoutés avant extraction  
5 des acides nucléiques avec du phénol/chloroforme/alcool isoamylique (Sigma ref. P 3803), et précipitation à l'acétate de sodium comme décrit précédemment. L'ADN précipité après centrifugation est resuspendu dans 10 µl de tampon 10 mM Tris pH 7.5. Puis, 5 µl de cette  
10 suspension ont été mélangés avec 20 µl de tampon Taq 5 fois concentré , 20 µl de 5 mM dATP, 1 µl (5U) de Taq ADN polymerase (Amplitaq™) et 54 µl d'eau distillée stérile. Ce mélange est incubé 2 h à 75°C avec un film d'huile à la surface de la solution. L'ADN en suspension dans la  
15 solution aqueuse prélevée en dessous du film d'huile après incubation est précipité comme décrit précédemment et resuspendu dans 2 µl d'eau distillée stérile. L'ADN obtenu a été inséré dans un plasmide à l'aide du kit TA Cloning™. Les 2 µl de solution d'ADN ont été mélangés  
20 avec 5 µl d'eau distillée stérile, 1µl d'un tampon de ligation 10 fois concentré "10X LIGATION BUFFER", 2µl de "pCR™ VECTOR" (25 ng/ml) et 1 µl de "TA DNA LIGASE". Ce mélange a été incubé une nuit à 12°C. Les étapes suivantes ont été réalisées conformément aux instructions données  
25 dans le kit TA Cloning® (British Biotechnology). A la fin de la procédure, les colonies blanches de bactéries recombinantes (white) ont été repiquées pour être cultivées et permettre l'extraction des plasmides incorporés selon la procédure dite de "miniprep" (Sambrook  
30 J., Fritsch E.F., et Maniatis T., Molecular cloning, a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press, 1989). La préparation de plasmide de chaque colonie recombinante a été coupée par une enzyme de restriction appropriée et analysée sur gel d'agarose. Les plasmides  
35 possédant un insert détecté sous lumière UV après marquage du gel au bromure d'éthidium, ont été sélectionnés pour le

séquençage de l'insert, après hybridation avec une amorce complémentaire du promoteur Sp6 présent sur le plasmide de clonage du TA cloning kit. La réaction préalable au séquençage a ensuite été effectuée selon la méthode préconisée pour l'utilisation du kit de séquençage "Prism ready reaction kit dye deoxyterminator cycle sequencing kit" (Applied Biosystems, ref. 401384) et le séquençage automatique a été réalisé avec l'appareil "automatic sequencer", modèle 373 A Applied Biosystems selon les instructions du fabricant.

- Analyse des séquences clonées :

L'analyse discriminante sur les banques de données informatiques des séquences clonées à partir des fragments d'ADN présents dans le mélange réactionnel a permis de mettre en évidence trois catégories de séquences : la première correspondait à des séquences totalement inconnues dans les banques de données et sans aucune parenté avec des gènes décrits. La seconde, correspondait à des séquences totalement homologues à des portions de gènes cellulaires connus. La troisième correspondait à des séquences présentant des homologies partielles plus ou moins importantes avec des séquences connues de rétrovirus ou d'éléments génétiques rétrotransposables comme les rétroposons ou rétrotransposons.

L'origine des séquences de la première catégorie est difficile à définir alors que pour la seconde, elle s'explique par la présence attendue de fragments d'ADN cellulaire contaminant la fraction d'acides nucléiques extraits de l'échantillon viral concentré mais non purifié, après incubation dans les conditions requises pour la réaction de transcription inverse endogène sus-mentionnée.

L'origine des séquences de la troisième catégorie est manifestement rétrovirale ou de type rétroviral. Il est connu que des séquences rétrovirales endogènes apparentées à un rétrovirus réplicatif, ou co-exprimées dans une même cellule infectée, peuvent être encapsidées

dans les virions générés par une souche rétrovirale donnée (Linial M.L. and Miller A.D. dans "Current topics in microbiology and immunobiology. Retroviruses, strategies of replication" vol. 157, p. 125-152; Swanstrom R. et Vogt P.K. éditeurs, Springer-Verlag, Heidelberg 1990) et la présence de certaines séquences de type rétroviral peut s'expliquer par ce phénomène.

Cependant, parmi les séquences de cette catégorie, une séquence a été retrouvée le plus fréquemment et s'est avérée représenter la majorité des clones obtenus dans ces conditions à partir de l'isolat viral "POL-2" issu de la culture de la lignée PLI-2 entre le quarantième et le soixantième passage en culture après établissement de la lignée continue selon le principe décrit dans le brevet n°WO 93/20188 précédemment cité. Le clone correspondant PSJ17 a été entièrement séquencé et la séquence obtenue, présentée dans la figure 6 (SEQ ID N05) a été analysée à l'aide du logiciel "Geneworks®" sur les banques de données actualisées "Genbank®". L'analyse des banques de données n'a pas permis de trouver de séquence identique déjà décrite. Seule une homologie partielle a pu être retrouvée avec certains éléments rétroviraux connus. L'homologie relative la plus intéressante concerne un rétrovirus endogène dénommé ERV-9, ou HSERV-9, selon les références (La Mantia et coll. Nucleic Acids Research 1991 ; 19, 1513-1520). Ainsi la séquence du clone PSJ17 a pu être localisée dans la région pol codant pour la transcriptase inverse d'un rétrovirus, ou encore d'un virus possédant une enzyme avec une activité transcriptase inverse, par alignement avec la séquence décrite pour HSERV-9.

**EXEMPLE 5 : OBTENTION DE CLONES, DEFINISSANT UNE FAMILLE MSRV-2A, PAR AMPLIFICATION DES REGIONS POL CONSERVEES DES RETROVIRUS SUR UNE PREPARATION DE VIRION ISSUE DE LA LIGNEE LM7.**

L'approche moléculaire a consisté à utiliser une technique PCR permettant d'amplifier une région relativement conservée du gène pol des rétrovirus exogènes et endogènes, mais aussi des virus codant pour une enzyme à activité transcriptase inverse tels que notamment le virus de l'hépatite B, qui a été publiée par Shih et coll. (Shih A., Misra R., and Rush M.G. Detection of multiple, novel reverse transcriptase coding sequences in human nucleic acids : relation to primate retroviruses. J. Virol. 1989 ; 63, 64-75). Cette technique a été utilisée sur l'ARN extrait d'une préparation de virions purifiés, obtenus selon le protocole décrit ci-après, à partir des surnageants de la culture LM7 d'origine (Perron et coll. Res. Virol. 1989 ; 140, 551-561) gardés congelés à -80°C depuis lors : les surnageants de cultures sont collectés deux fois par semaine, pré-centrifugés à 10 000 tpm pendant 30 minutes pour éliminer les débris cellulaires, et ensuite congelés à -80°C ou utilisés tels que pour les étapes suivantes.

Les surnageants frais ou décongelés sont centrifugés sur un coussin de PBS-glycérol 30 % à 100 000g (ou 30 000 tpm dans un rotor LKB-HITACHI de type 45 T) pendant 2 h à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot sédimenté est repris dans un petit volume de PBS et constitue la fraction de virions concentrés, mais non purifiés. Le virus concentré est ensuite déposé sur un gradient de sucrose dans un tampon PBS stérile (15 à 50 % poids/poids) et ultracentrifugé à 35 000 tpm (100 000g) pendant 12 h à +4°C dans un rotor à godets. 10 fractions sont recueillies et 20 µl sont prélevés dans chaque fraction après homogénéisation pour y doser l'activité transcriptase inverse selon la technique décrite par H. Perron et coll. (Res. Virol. 1989 ; 140, 551-561). Les fractions contenant le pic d'activité RT de type LM7 sont ensuite diluées dans du tampon PBS stérile et ultracentrifugées une heure à 35 000 tpm (1 000 000 g)

pour sédimenter les particules virales. Le culot de virions purifiés ainsi obtenu est alors repris dans un petit volume d'un tampon adéquat pour l'utilisation ultérieure qui en sera faite (Ex. Tampon Guanidium Thiocyanate pour l'extraction des ARN; PBS stérile pour le stockage à  $-80^{\circ}\text{C}$ ).

Préalablement à la réaction PCR, l'ARN de l'échantillon a été transcrit en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide du Kit "cDNA synthesis system plus" (Amersham), selon les instructions du fabricant et en se basant sur une valeur approximée à un log près de la quantité d'ARN présente dans notre échantillon. Après amplification PCR selon la technique de Shih et coll., le matériel nucléaire obtenu a été déposé sur un gel avec 2 % d'agarose et la bande visualisée sous lumière ultraviolette après marquage au bromure d'éthidium dans une région de poids moléculaire d'environ 100 paires de bases a été découpée et les acides nucléiques contenus, extraits selon le protocole usuel (Sambrook J., Fritsch E.F., et Maniatis T., Molecular cloning, a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press, 1989), puis clonés en utilisant le kit TA cloning KIT® (British Biotechnology) et les procédures conseillées dans les protocoles joints au kit, puis séquencés, tel que décrit ci-après : les produits issus de la purification sur gel d'agarose sont resuspendus dans 10ml d'eau distillée. Une des propriétés de la polymérase Taq consistant à ajouter une adénine à l'extrémité 3' de chacun des deux brins d'ADN, l'ADN obtenu a été directement inséré dans un plasmide à l'aide du kit TA Cloning™ (British Biotechnology). Les 2 µl de solution d'ADN ont été mélangés avec 5 µl d'eau distillée stérile, 1 µl d'un tampon de ligation 10 fois concentré "10X LIGATION BUFFER", 2 µl de "pCR™ VECTOR" (25 ng/ml) et 1 µl de "TA DNA LIGASE". Ce mélange a été incubé une nuit à  $12^{\circ}\text{C}$ . Les étapes suivantes ont été réalisées conformément aux instructions du kit TA Cloning® (British



Biotechnology). A la fin de la procédure, les colonies blanches de bactéries recombinantes (white) ont été repiquées pour être cultivées et permettre l'extraction des plasmides incorporés selon la procédure dite de  
5 "miniprep" (Sambrook J., Fritsch E.F., et Maniatis T., Molecular cloning, a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press, 1989). Le plasmide de chaque colonie recombinante a été coupé par une enzyme de restriction appropriée et analysé sur gel d'agarose. Les plasmides  
10 possédant un insert détecté sous lumière UV après marquage du gel au bromure d'éthidium, ont été sélectionnés pour le séquençage de l'insert, après hybridation avec une amorce complémentaire du promoteur Sp6 présent sur le plasmide de clonage du TA Cloning kit. La réaction préalable au  
15 séquençage a ensuite été effectuée selon la méthode préconisée pour l'utilisation du kit de séquençage "Prism ready reaction kit dye deoxyterminator cycle sequencing kit" (Applied Biosystems, ref. 401384) et le séquençage automatique a été réalisé avec l'appareil "automatic  
20 sequencer", modèle 373 A Applied Biosystems selon les instructions du fabricant.

Les séquences obtenues ont ensuite été analysées à l'aide des logiciels Mac Vector® et Geneworks® sur banque de données informatiques Genbank®, pour les séquences  
25 nucléiques, et Swiss Prot®, pour les séquences en acides aminés déduites des trames de lecture mises en évidence dans les séquences nucléiques. L'analyse des séquences obtenues à partir d'échantillon viral provenant des surnageants LM7 décongelés et purifié au pic d'activité  
30 transcriptase inverse sur gradient de saccharose, a mis en évidence trois catégories de séquences. Une première catégorie, correspondant à des associations artéfactuelles des amorces nucléiques utilisées pour l'amplification PCR, une deuxième catégorie correspondant à des séquences sans  
35 trame de lecture ouverte consistante et une troisième catégorie correspondant à des séquences rétrovirales dans

la région "pol" attendue de par les amorces utilisées, et présentant au moins une trame de lecture ouverte conséquente.

Dans cette troisième catégorie, on a pu distinguer  
5 des séquences strictement homologues à des souches du murine leukaemia virus qui ont été retrouvées par la même approche méthodologique, dans des tubes témoins ne mettant en présence que de l'eau et l'enzyme transcriptase inverse du Moloney-murine leukaemia virus utilisée pour la  
10 synthèse de l'ADNc. Il est apparu évident que ces séquences provenaient de contaminants nucléiques associés à cette enzyme de rétrovirus murin utilisée pour cette étape réactionnelle. On a pu aussi y distinguer des séquences représentées par un nombre de clones allant de  
15 un à trois, et strictement homologues à des rétrovirus endogènes humains connus. Ces mêmes séquences ont été détectées dans des échantillons témoins ne provenant pas de SEP, traités dans les mêmes conditions. Enfin, on a aussi pu y distinguer une séquence représentée par une  
20 population majoritaire de clones (environ 42 % des clones), relativement à la représentativité individuelle des autres séquences (toujours inférieure à 5 %, voire 10 % pour un petit nombre), et présentant des homologies partielles avec des rétrovirus connus dans la région "pol" attendue. L'interrogation de la banque de données  
25 Genbank® actualisée à ce jour (version 79, novembre 93) n'a pas permis de mettre en évidence de séquence identique ou présentant des homologies significatives.

Cette séquence est présentée dans la figure 9.  
30 Elle présente un cadre de lecture ouvert en phase avec les deux amorces PCR retrouvées aux extrémités mais elle est plus courte que l'ensemble des séquences rétrovirales connues dans la région attendue entre ces amorces. Une "délétion" de 45 paires de bases (15 acides aminés) y est  
35 observée à la suite de la séquence de l'amorce "amont", alors que les séquences précédant l'amorce "aval" sont

présentes. Cependant la trame de lecture est ouverte et ininterrompue sur toute la séquence incluant les amorces et la séquence en acides aminés déduite présente une homologie significative avec la région correspondante des rétrovirus connus. Dans la séquence interne aux amorces PCR, les acides aminés E, R, Q, P et D, normalement assez bien conservés dans cette région pol des rétrovirus et des virus avec activité transcriptase inverse connus (Shih et coll. J. Virol. 1989; 63, 64-75) sont retrouvés conservés aux bonnes positions dans la trame de lecture de notre séquence originale.

Etant donné que cette séquence est suffisamment divergente des séquences rétrovirales déjà décrites dans les banques de données on peut avancer qu'il s'agit d'une séquence appartenant à un nouveau virus que nous dénommerons MSRV-2A. Ce virus s'apparente à priori, d'après l'analyse des séquences obtenues, à un rétrovirus, mais, étant donnée la technique utilisée pour obtenir cette séquence, il pourrait aussi s'agir d'un virus à ADN dont le génome code pour une enzyme qui possède accessoirement une activité transcriptase inverse comme c'est le cas, par exemple, pour le virus de l'hépatite B, HBV (Shih et coll. J. Virol. 1989; 63, 64-75).

25

**EXEMPLE 6 : OBTENTION DE CLONES, DEFINISSANT UNE FAMILLE MSRV-2B, PAR AMPLIFICATION PCR "NICHEE" DES REGIONS POL CONSERVEES DES RETROVIRUS SUR DES PREPARATIONS DE VIRIONS ISSUES DES LIGNEES LM7 ET PLI-2.**

30

Une technique PCR dérivée de la technique publiée par Shih et coll. a été utilisée. Cette technique permet, par traitement de tous les composants du milieu réactionnel par la DNase, d'éliminer toute trace d'ADN contaminant. Elle permet parallèlement, par l'utilisation d'amorces différentes mais chevauchantes dans deux séries

35

successives de cycles d'amplifications PCR, d'augmenter les chances d'amplifier un ADNc résultant d'une quantité d'ARN faible au départ et encore réduite dans l'échantillon par l'action parasite de la DNase sur l'ARN; ce, d'autant plus la DNase est utilisée dans des conditions d'activité en excès qui permettent d'éliminer toute trace d'ADN contaminant avant inactivation de cette enzyme restant dans l'échantillon par chauffage à 85°C pendant 10 minutes. Par ailleurs, cette variante de la technique PCR décrite par Shih et coll, a été utilisée sur des fractions de virions, purifiés, comme décrit dans l'exemple 1, comme précédemment pour les surnageants congelés des cultures LM7, issus cette fois de lignée lymphoblastoïde B spontanée provenant d'un nouveau cas de SEP, de la culture PLI-2 (ECACC n° 92072201) et de la culture LM7PC (ECACC n°93010817), ces deux dernières cultures ayant été obtenues selon les méthodes ayant fait l'objet du brevet n° WO 93/20188.

Après clonage avec le TA cloning kit® des produits amplifiés par cette technique et analyse de la séquence à l'aide du séquenceur automatique selon ce qui est décrit dans l'exemple 1, les séquences ont été analysées à l'aide du logiciel Geneworks®, sur la dernière version (79, novembre 93) à ce jour de la banque de données Genebank®.

Cette technique a d'abord été appliquée à deux fractions de virions purifiés sur saccharose à partir de l'isolat "POL-2" produit par la lignée PLI-2 d'une part, et à partir de l'isolat MS7PG produit par la lignée LM7PC d'autre part. Les séquences clonées et séquencées à partir de ces deux échantillons correspondent à quatre catégories. Une première catégorie de séquence (type 1), correspond à des séquences amplifiées à partir de matériel nucléaire rétroviral contaminant la transcriptase inverse du MoMuLV utilisée pour l'étape de synthèse de l'ADN complémentaire, ainsi que cela a déjà été signalé

précédemment. La deuxième catégorie (type 2), retrouvée dans la majorité des clones (55 % des clones issus des isolats POL-2 des culture PLI-2, et, 67 % des clones issus des isolats MS7PG des cultures LM7PC) correspond à une  
5 famille de séquences "pol" proches mais différentes du rétrovirus endogène humain dénommé ERV-9 ou HSERV-9. La troisième catégorie (type 3) correspond à des séquences très fortement homologues à la séquence attribuée au virus nommé MSRV-2A et obtenue précédemment à partir des  
10 surnageants de culture LM7 (voir exemple 1) par la technique non modifiée de shih et coll. Cependant la proportion des clones de cette catégorie est inférieure à celle qui a été trouvée précédemment sur l'isolat viral issu de la culture LM7 (5 % des clones issus des isolats  
15 POL-2 des culture PLI-2, et, 6 % des clones issus des isolats MS7PG des cultures LM7PC). La quatrième catégorie correspond à diverses séquences trouvées généralement en un exemplaire, ainsi qu'une de type rétroviral endogène, cependant jamais retrouvées par d'autres approches ou dans  
20 d'autres échantillons provenant de culture exprimant une activité transcriptase inverse de type LM7.

La troisième catégorie de séquences obtenues dans cette expérience, est identique aux séquences "pol" de type MSRV-2A obtenues précédemment, à quelques mutations près  
25 qui peuvent s'expliquer par une variabilité normale du génome viral et par des erreurs des enzymes transcriptase inverse et taq-polymérase utilisées dans cette technique. Cependant, lors de cette deuxième approche utilisant une modification de la technique décrite par Shih et coll.,  
30 une duplication a priori artéfactuelle de l'amorce aval ("amorce 3'") a été observée. Ceci peut provenir de la configuration des amorces chevauchantes utilisées pour les deux séries de cycles d'amplification PCR (technique "semi-nested"). La séquence consensus de ces clones est  
35 présentée dans la figure 3. La trame de lecture fonctionnelle correspondante, une représentation de la

dans la région communément clonée, à savoir le remplacement de la méthionine M retrouvée dans la région de l'amorce PCR par une valine V, substituant ainsi le motif YVDD, au motif YMDD.

5 L'analyse dans les banques de données de cette dernière séquence, obtenue par cette technique modifiée sur des échantillons viraux distincts, ne modifie en rien le fait qu'aucune homologie significative n'est trouvée avec des séquences déjà répertoriées dans la base de  
10 données Genbank®. Cependant, une analogie certaine de la séquence acides aminés avec la région équivalente des rétrovirus connus existe. Cette analogie fait intervenir, comme dans les clones issus de la technique précédente, une délétion suivant l'amorce amont. Cette séquence est,  
15 ici aussi, compatible avec un génome rétroviral inconnu ou avec un génome viral ARN (transcrit en ADNc dans notre protocole) codant pour une enzyme ayant une activité transcriptase inverse. En effet, les virus de l'hépatite B et de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) qui ne sont pas  
20 des rétrovirus mais qui possèdent une polymérase à activité transcriptase inverse ont pu être amplifiés selon la technique de Shih et coll. De plus, le CaMV (clone CaMV QG-YM) possède une délétion dans cette région mais, contrairement à notre séquence de type MSRV-2, elle se  
25 situe du côté de l'amorce aval (amorce 3').

**EXEMPLE 7 : OBTENTION DE CLONES, DEFINISSANT UNE FAMILLE MSRV-2B, PAR AMPLIFICATION PCR "NICHEE" DES REGIONS POL CONSERVEES DES RETROVIRUS SUR DES PREPARATIONS  
30 DE LYMPHOCYTES B D'UN NOUVEAU CAS DE SEP.**

Enfin, la même technique PCR modifiée d'après la technique de Shih et coll. a été utilisée pour amplifier et séquencer le matériel nucléique ARN présent dans une fraction de virions purifiés au pic d'activité  
35 transcriptase inverse "de type LM7" sur gradient de saccharose, selon les protocoles décrits dans l'exemple 5,

à partir d'une lignée lymphoblastoïde spontanée, obtenue par auto-immortalisation en culture de lymphocytes B d'un patient SEP séropositif pour le virus d'Epstein-Barr (EBV) après mise en culture des cellules lymphoïdes sanguine  
5 dans un milieu de culture approprié contenant une concentration appropriée de cyclosporine A. De même, les surnageants de culture d'une lignée B obtenue dans les mêmes conditions à partir d'un témoin exempt de sclérose en plaques ont été traités dans les mêmes conditions et le  
10 dosage de l'activité transcriptase inverse dans les fractions du gradient de saccharose s'est avéré négatif partout (bruit de fond). La fraction 3 du gradient correspondant à la lignée B de SEP et la même fraction sans activité transcriptase inverse du gradient témoin  
15 non-SEP, ont été analysées par la même technique RT-PCR que précédemment, dérivée de Shih et coll., suivie des mêmes étapes de clonage et de séquençage, comme décrit dans l'exemple 5.

L'analyse des clones recombinants prélevés au  
20 hasard a fourni quatre catégories de séquences : une première catégorie de séquence (type 1), correspond à des séquences amplifiées à partir de matériel nucléaire rétroviral contaminant la transcriptase inverse du MoMuLV utilisée pour l'étape de synthèse de l'ADN complémentaire.  
25 La deuxième catégorie (type 2), correspond à une famille de séquences "pol" proches mais différentes du rétrovirus endogène humain dénommé ERV-9 ou HSERV-9.

La quatrième catégorie correspond à diverses séquences trouvées généralement en un exemplaire, ainsi  
30 qu'une de type rétroviral endogène, cependant jamais retrouvées par d'autres approches ou dans d'autres échantillons provenant de culture exprimant une activité transcriptase inverse de type LM7. Les résultats sont présentés dans le tableau annexé. Il est tout à fait  
35 notable que les séquences de type MSRV-2 soient retrouvées dans le seul matériel associé à un pic d'activité

transcriptase inverse "de type LM7" provenant de la lignée lymphoblastoïde B de SEP. Ces séquences n'ont pas été retrouvées avec le matériel de la lignée lymphoblastoïde B témoin (non-SEP) dans 26 clones recombinants pris au  
5 hasard. Seules les séquences contaminantes de types Mo-MuLV et des séquences sans analogie rétrovirale particulière ont été retrouvées chez ce témoin. La différence de résultats est à l'évidence hautement  
significative ( $\chi^2$ ,  $p < 0,001$ ). On y constate que la  
10 séquence en acide nucléique y est très conservée, à quelques mutations près, et que la seule variation de séquence acide aminés observée dans ces clones concerne la méthionine ou la valine du site amorce 3' YMDD/YVDD.



TABLEAU

5

REPARTITION DES SEQUENCES OBTENUES PAR PCR  
MODIFIEE D'APRES SHIH ET COLL. A PARTIR DE CULTURE-  
DE LYMPHOCYTES B D'UN PATIENT ATTEINT DE SCLEROSE  
EN PLAQUES VERSUS UN PATIENT CONTROLE

	TYPE 1	TYPE 2	TYPE 3 MSRV-2B	TYPE 4
Lympho B patient SEP	0 0%	11 48%	4 17%	8 35%
Lympho B patient non SEP	5 19%	0 0%	0 0%	21 81%

**REVENDEICATIONS**

1/ Matériel viral caractérisé en ce qu'il comprend un acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique consistant en la séquence nucléotidique SEQ ID N01 ou sa  
5 séquence complémentaire, ou une séquence équivalente, notamment une séquence nucléotidique, présentant au moins 50 % et préférentiellement au moins 70 % d'homologie avec la séquence nucléotidique SEQ ID N01 ou sa séquence  
10 complémentaire, et comprenant au moins 10 nucléotides contigus.

2/ Matériel viral caractérisé en ce qu'il comprend un acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique consistant en une séquence nucléotidique choisie parmi  
15 SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04 et SEQ ID N05 et leurs séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques d'au moins 10 nucléotides, présentant au moins 50 % et préférentiellement au moins 70 % d'homologie avec l'une  
20 quelconque des séquences nucléotidiques choisies parmi SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04 et SEQ ID N05 et leurs séquences complémentaires.

3/ Virus humain à l'état substantiellement isolé, possédant une activité transcriptase inverse, apparenté à une famille d'éléments rétroviraux endogènes et associé à  
25 la sclérose en plaques, issu d'une souche virale possédant une activité transcriptase inverse, choisie parmi les souches virales dénommées respectivement POL-2, déposée le 22.07.1992 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V92072202, et MS7PG déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC  
30 sous le numéro d'accès V93010816, et des souches variantes consistant en des virus comprenant au moins un antigène qui est reconnu par au moins un anticorps dirigé contre au moins un antigène correspondant de l'un ou l'autre des virus des souches virales POL-2 et MS7PG précitées.

35 4/ Virus humain à l'état substantiellement isolé, possédant une activité transcriptase inverse, apparenté à

une famille d'éléments rétroviraux endogènes, et associé à la sclérose en plaques, produit par une lignée cellulaire choisie parmi les lignées cellulaires dénommées respectivement PLI-2 déposée le 22.07.1992 auprès de  
5 l'ECACC sous le numéro d'accès 92072201 et LM7PC déposée le 08.01.93 auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 93010817, et toutes les cultures cellulaires infectées susceptibles de produire un virus comprenant au moins un antigène qui est reconnu par au moins un anticorps dirigé  
10 contre au moins un antigène correspondant de l'un ou l'autre des virus produits par les lignées PLI-2 et LM7PC précitées.

5/ Matériel rétroviral humain, associé à la sclérose en plaques, caractérisé en ce qu'il comprend un  
15 acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique d'au moins 10 nucléotides, présentant au moins 50 % d'homologie avec une séquence nucléotidique appartenant au gène *pol* du génome du rétrovirus ERV-9 ou HSERV-9.

6/ Matériel rétroviral humain associé à la  
20 sclérose en plaques, caractérisé en ce qu'il comprend un acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique codant pour une séquence peptidique d'au moins 10 acides aminés, présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence peptidique codée  
25 par le gène *pol* du génome du rétrovirus ERV-9 ou HSERV-9.

7/ Matériel rétroviral humain, associé à la sclérose en plaques, caractérisé en ce qu'il comprend un acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique codant pour une séquence peptidique d'au moins 10 acides  
30 aminés, présentant au moins 50 % et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence peptidique codée par la séquence nucléotidique SEQ ID N01, ou sa séquence complémentaire, ou par toute séquence équivalente.

8/ Matériel rétroviral humain, associé à la  
35 sclérose en plaques, caractérisé en ce qu'il comprend un acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique

codant pour une séquence peptidique d'au moins 10 acides aminés, présentant au moins 50 % et de préférence au moins 70 % d'homologie avec une séquence peptidique codée par l'une quelconque des séquences nucléotidiques choisies  
5 parmi SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04 et SEQ ID N05, leurs séquences complémentaires, et leurs séquences équivalentes.

9/ Matériel viral humain selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, associé à un matériel viral  
10 comprenant un acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique consistant en la séquence nucléotidique SEQ ID N06 ou sa séquence complémentaire, ou une séquence équivalente, notamment une séquence nucléotidique, présentant au moins 50 % et préférentiellement au moins  
15 70 % d'homologie avec la séquence nucléotidique SEQ ID N06 ou sa séquence complémentaire, et comprenant au moins 10 nucléotides contigus.

10/ Lignée cellulaire déposée le 08.01.1993, auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès 93010817.

20 11/ Souche virale déposée le 08.01.1993, auprès de l'ECACC sous le numéro d'accès V93010816

12/ Fragment nucléotidique caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique consistant en SEQ ID N01 ou sa séquence complémentaire, ou une séquence  
25 équivalente, notamment une séquence nucléotidique d'au moins 10 nucléotides, présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec la séquence nucléotidique SEQ ID N01 ou sa séquence complémentaire.

13/ Fragment selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il consiste en une séquence  
30 nucléotidique identique à SEQ ID N01 ou sa séquence complémentaire, ou une séquence équivalente, notamment une séquence nucléotidique, présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec la séquence  
35 nucléotidique SEQ ID N01 ou sa séquence complémentaire.

14/ Fragment nucléotidique caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04 et SEQ ID N05, leurs séquences complémentaires, et leurs séquences  
5 équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques d'au moins 10 nucléotides, présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec l'une quelconque des séquences nucléotidiques choisies parmi SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04 et SEQ ID N05, et leurs séquences  
10 complémentaires.

15/ Fragment nucléotidique selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il est identique à une séquence nucléotidique choisie parmi SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04 et SEQ ID N05, leurs séquences complémentaires,  
15 et leurs séquences équivalentes, notamment les séquences nucléotidiques d'au moins 10 nucléotides, présentant au moins 50 %, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec l'une quelconque des séquences nucléotidiques choisies parmi SEQ ID N02, SEQ ID N03, SEQ ID N04 et SEQ  
20 ID N05 et leurs séquences complémentaires.

16/ ARN ou ADN et notamment vecteur de réplication, comprenant un fragment selon l'une des revendications 12 à 15.

17/ Amorce spécifique pour l'amplification par polymérisation d'un ARN ou d'un ADN d'un virus associé à la sclérose en plaques, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique identique ou équivalente à au moins une partie d'un fragment selon l'une quelconque des revendications 12 à 15, notamment une  
25 séquence nucléotidique présentant au moins 50%, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec au moins une partie dudit fragment.  
30

18/ Amorce selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'elle possède la séquence nucléotidique SEQ ID  
35 N07.

- 19/ Sonde susceptible de s'hybrider spécifiquement avec un ARN ou un ADN d'un virus associé à la sclérose en plaques, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique identique ou équivalente à au moins une partie d'un fragment selon l'une quelconque des revendications 12 à 15, notamment une séquence nucléotidique présentant au moins 50%, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec au moins une partie dudit fragment.
- 20/ Sonde selon la revendication 19, caractérisée en ce qu'elle a au moins 10 nucléotides.
- 21/ Utilisation d'une sonde selon la revendication 19 ou 20, ou d'une amorce selon la revendication 17 ou 18, pour détecter et/ou identifier, dans un échantillon biologique, un virus associé à la sclérose en plaques.
- 22/ Composition thérapeutique antisens, notamment pour le traitement de la sclérose en plaques, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une séquence nucléotidique identique ou équivalente à au moins une partie d'un fragment selon l'une quelconque des revendications 12 à 15, notamment une séquence nucléotidique présentant au moins 50%, et de préférence au moins 70 % d'homologie avec au moins une partie dudit fragment.
- 23/ Procédé pour détecter et/ou identifier un virus associé à la sclérose en plaques, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'on expose un ARN et/ou un ADN spécifique audit virus, et/ou leur ADN et/ou ARN complémentaires, à au moins une séquence nucléotidique selon la revendication 19 ou 20.
- 24/ Procédé selon la revendication 23 caractérisé en ce que, avant d'exposer l'ARN et/ou l'ADN ou leur ADN et/ou ARN complémentaires, à la sonde, on hybride ledit ARN et/ou ledit ADN avec au moins une amorce selon la revendication 17 ou 18 et on amplifie ledit ARN et/ou ADN.
- 25/ Procédé pour quantifier, dans un échantillon biologique, l'expression d'un virus associé à la sclérose

en plaques, caractérisé en ce qu'on expose un ARN et/ou un ADN spécifique audit virus et/ou leur ADN et/ou ARN complémentaires, à au moins une sonde selon la revendication 19 ou 20.

5           26/ Peptide à l'état substantiellement isolé, codé par la séquence nucléotidique du génome d'un virus associé à la sclérose en plaques, caractérisé en ce qu'il est codé par au moins une partie d'un fragment nucléotidique selon l'une des revendications 11 à 15.

10           27/ Protéine caractérisée en ce qu'elle comprend un peptide selon la revendication 26.

          28/ Oligopeptide caractérisé en ce qu'il comprend au moins cinq aminoacides contigus d'un peptide selon la revendication 26.

15           29/ Composition diagnostique, et/ou thérapeutique et/ou prophylactique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un peptide selon la revendication 26.

          30/ Composition diagnostique, et/ou thérapeutique et/ou prophylactique, caractérisée en ce qu'elle comprend  
20 au moins une protéine selon la revendication 27.

          31/ Composition diagnostique, et/ou thérapeutique et/ou prophylactique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un oligopeptide selon la revendication 28.

          32/ Composition diagnostique, et/ou thérapeutique,  
25 et/ou vaccinale, et/ou prophylactique, caractérisée en ce qu'elle comprend un ligand spécifique d'au moins un peptide selon la revendication 26.

          33/ Composition diagnostique, et/ou thérapeutique, et/ou vaccinale, et/ou prophylactique, caractérisée en ce  
30 qu'elle comprend un ligand spécifique d'au moins une protéine selon la revendication 27.

          34/ Composition diagnostique, et/ou thérapeutique, et/ou vaccinale, et/ou prophylactique, caractérisée en ce qu'elle comprend un ligand spécifique d'au moins un  
35 oligopeptide selon la revendication 28.

1/6

FIG 1

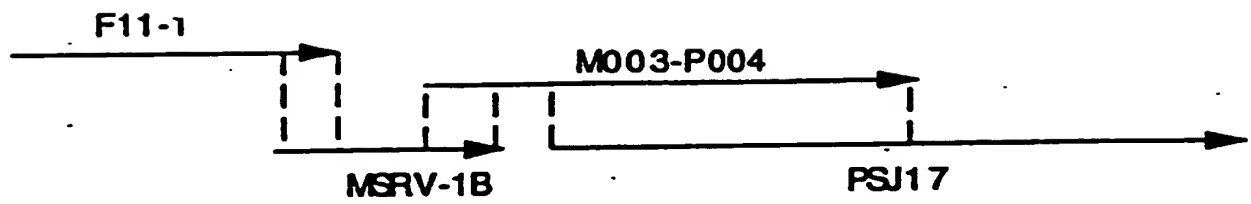
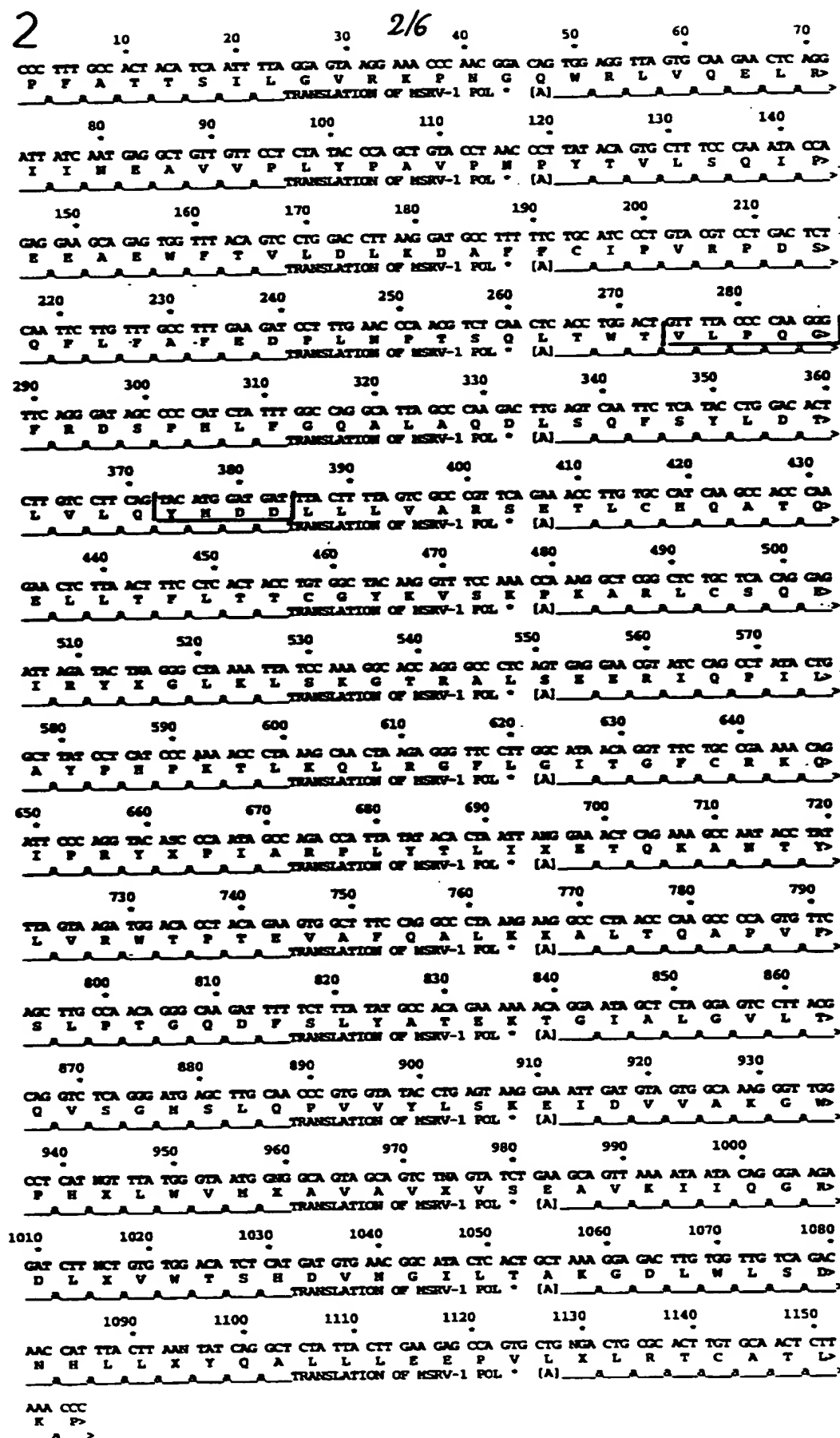




FIG 2



3/6

```

10 * 20 * 30 * 40 * 50 * 60 * 70 *
CCC TTT GCC ACT ACA TCA ATT TTA GGA GTA AGG AAA CCC AAC GGA CAG TGG AGG TTA GTG CAA GAA CTC AGG
P F A T T S I L G V R K P N G Q W R L V Q E L R>
TRANSLATION OF F11-1 [A]

80 * 90 * 100 * 110 * 120 * 130 * 140 *
ATT ATC AAT GAG GCT GTT GTT CCT CTA TAC CCA GCT GTA CCT AAC CCT TAT ACA GTG CTT TCC CAA ATA CCA
I I N E A V V P L Y P A V P N P Y T V L S Q I P>
TRANSLATION OF F11-1 [A]

150 * 160 * 170 * 180 * 190 * 200 * 210 *
GAG GAA GCA GAG TGG TTT ACA GTC CTG GAC CTT AAG GAT GCC TTT TTC TGC ATC CCT GTA CGT CCT GAC TCT
E E A E W F T V L D L K D A F F C I P V R P D S>
TRANSLATION OF F11-1 [A]

220 * 230 * 240 * 250 * 260 * 270 * 280 *
CAA TTC TTG TTT GCC TTT GAA GAT CCT TTG AAC CCA ACG TCT CAA CTC ACC TGG ACT GTT TTA CCC CAA GGG
Q F L F A F E D P L N P T S Q L T W T V L P Q G>
TRANSLATION OF F11-1 [A]

```

290 \*

```

TTC AAG GGA
F K G>

```

FIG 3

4/6

## FIG 4

## CONSENSUS A

Consensus GTTACAGGGAT ANOCCATC TCTTTGGTCA GGTACTGGCC CAAGATCTAG 50  
 Consensus GCACTTCTC AGGTCCAGSN ACTCTGTGCC TTCAG 85

## CONSENSUS B

Consensus GTTACAGGGAT AGCCCCATC TATTTGGCCA GGCCTAGCT CAATACTGA 50  
 Consensus GCACTTCTC ATACTGGAC ATCTGTGCC TTGGT 86

## CONSENSUS C

Consensus GTTACAGGAT AGCCCCATC TATTTGGCCW RGYATTAGCC CAAGACTGA 50  
 Consensus GCACTTCTC ATACTGGAC ACTCTGTGCC TTYRG 85

## CONSENSUS D

Consensus GTTACAGGGAT AGCTOOCATC TATTTGGCCT GGCATTAAOC OGAGACTTAA 50  
 Consensus GCACTTCTY ATACTGGAC ACTCTGTGCC TTGG 85

## CONSENSUS GENERAL MSRV-1B AVEC AMORCES D'AMPLIFICATION

Consensus GTGTGOCAC AGGGGTTTAR RGATANCYCY CATCTMTTIG GYWRGYAYT  
 Consensus RRCYCRAKAY YTRRGYCAVT TCTYAKRYSY RGSNAYTCTB KYOCTTYRGT  
 Consensus ACATGGATGA C

## FIG 5

5/6

TCAGGGATAGCCCCATCTATTTGGCCAGGCATTAGCCCAAGACTTGAGTC  
AATTCTCATACCTGGACACTCTTGTCTTCAGTACATGGATGATTTACTTT  
TAGTCGCCCCGTT CAGAAACCTTGTGCCATCAAGCCACCCAAGAACTCTTAA  
CTTTCCTCACTACCTGTGGCTACAAGGTTTCCAAACCAAAGGCTCGGCTCT  
GCTCACAGGAGATTAGATACTNAGGGCTAAAATTATCCAAAGGCACCAGG  
GCCCTCAGTGAGGAACGTATCCAGCCTATACTGGCTTATCCTCATCCCAA  
ACCCTAAAGCAACTAAGAGGGTTCCTTGGCATAACAGGTTTCTGCCGAAA  
ACAGATTCCCAGGTACASCCCAATAGCCAGACCATTATATACACTAATTA  
NGGAAACTCAGAAAGCCAATACCTATTTAGTAAGATGGACACCTACAGAA  
GTGGCTTTCCAGGCCCTAAAGAAGGCCCTAACCCAAGCCCCAGTGTT CAGC  
TTGCCAACAGGGCAAGATTTTTCTTTATATGCCACAGAAAAAACAGGAAT  
AGCTCTAGGAGTCCTTACGCAGGTCTCAGGGATGAGCTTGCAACCCGTGGT  
ATACCTGAGTAAGGAAATTGATGTAGTGGCAAAGGGTT

## FIG 6

CAAGCCACC AAGAACTCTT AAATTTCCTC ACTACCTGTG GCTACAAGGT	50
TTCCAAACCA AAGGCTCAGC TCTGCTCACA GGAGATTAGA TACTTAGGGT	100
TAAATTATC CAAAGGCACC AGGGGCTCA GTGAGGAACG TATCCAGCT	150
ATACTGGGTT ATCTCATOC CAAACCTTA AAGCAACTAA GAGGGTTCCT	200
TAGCATGATC AGGTTTCTGC CGAAAACAAG ATTCCAGGT ACAACAAAA	250
TAGCCAGACC ATTATATACA CTAATTAAAG AAACTCAGAA AGCCAATACC	300
TATTAGTAA GATGGACACC TAAACAGAAG GCTTTCCAGG CCTTAAGAA	350
GGCCTAAC CAAAGCCACG TGTTCAGCTT GCCAACAGGG CAAGATTTTT	400
CTTTATATGG CACAGAAAA ACAGGAATCG CTCAGGAGT CCTTACACAG	450
GTCGAGGGA TGAGCTTGA ACCGTGGCA TACCTGAATA AGGAAATGA	500
TGTAAGGCA AAGGTTGGC CTCATNGTTT ATGGGTAAATG GNGGCAGTAG	550
CAGTCINAGT ATCTGAAGCA GTTAAATAA TACAGGGAAG AGATCTINCT	600
GTGTGGACAT CTCATGATGT GAAAGGCATA CTCCTGCTA AAGGAGACTT	650
GTTGTGTICA GACAACATT TACTTAANTA TCAGGCTCTA TTAATTGAAG	700
AGCCAGTCT GNGACTGGC ACTTGTGCAA CTCCTTAACC C	741

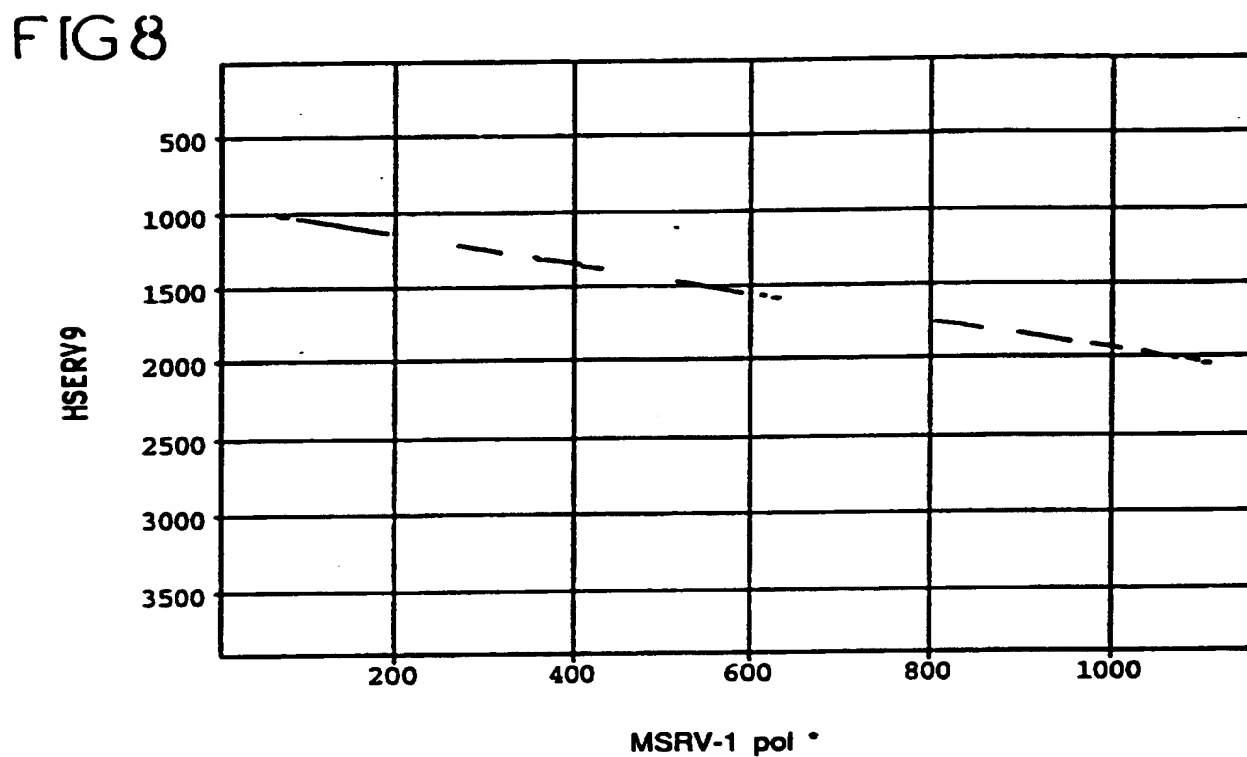
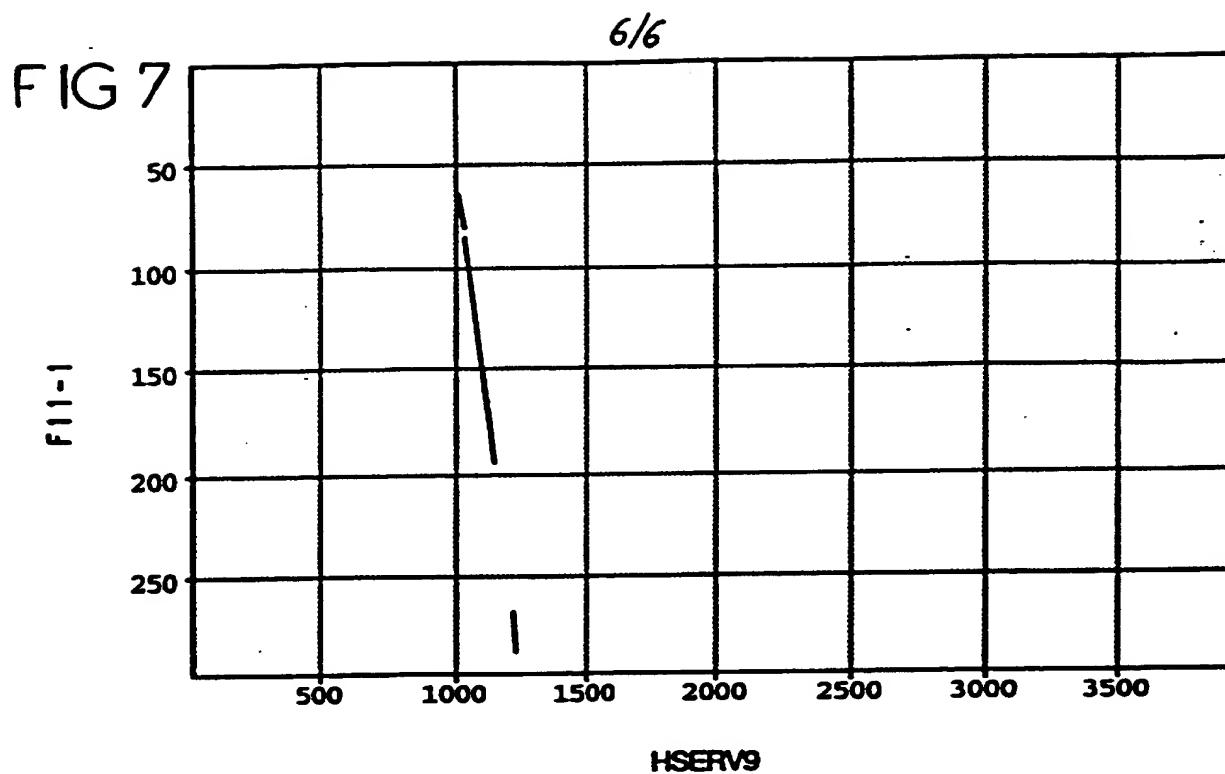


FIG 9

pol SHIH	TGGAAAGTGT	TGCCACAGGG	CGCTGAAGCC	TATCGCGTGC	AGTTGCCGGA	50
pol SHIH	TGCCGCCTAT	AGCCTCTACA	TGGATGACAT	CCTGCTGGCC	TCC	93

INSTITUT NATIONAL

de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

## RAPPORT DE RECHERCHE

## PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

FA 510957

FR 9414322

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,X	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 19, no. 7, 1991 OXFORD GB, pages 1513-1520, G. LA MANTIA 'Identification and characterization of novel human endogenous retroviral sequences preferentially expressed in undifferentiated embryonal carcinoma cells' * le document en entier *	1,2,12, 16
D,A	WO-A-93 20188 (BIO MERIEUX) * le document en entier *	10,11
X	VIROLOGY, vol. 158, no. 1, Mai 1987 pages 88-102, J. MERREGAERT ET AL 'Nucleotide sequence of a radiation leukemia virus genome' * figure 1 *	2
A	AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, vol. 8, no. 5, Mai 1992 page 922 H. PERRON ET AL 'Retrovirus isolation from patients with multiple sclerosis: epiphenomenon or causative factor ?' * abrégé *	1-34
D,A	LANCET THE, vol. 337, no. 8745, 6 Avril 1991 LONDON GB, pages 862-863, H. PERRON ET AL 'Isolation of retrovirus from patients with Multiple Sclerosis' * le document en entier *	1-4,7-11
---		
-/--		
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
12 Mars 1996		Le Cornec, N
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons A : membre de la même famille, document correspondant</p>		

3

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)

**INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE**

# RAPPORT DE RECHERCHE PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

FA 510957  
FR 9414322

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	RESEARCH IN VIROLOGY, vol. 143, no. 5, 1992 pages 337-350, H. PERRON ET AL 'In vitro transmission and antigenicity of a Retrovirus isolated from a Multiple Sclerosis patient' * le document en entier *	1-5,7-34
D,A	JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 74, 1993 pages 65-72, H. PERRON ET AL 'Herpes Simplex Virus ICP0 and ICP4 immediate early proteins strongly enhance expression of a retrovirus harboured by a leptomeningeal cell line from a patient with Multiple Sclerosis' * le document en entier *	1-4,7-11
A	WO-A-93 07259 (SCLEROSE-FORENINGEN ( THE DANISH MS-SOCIETY )) * le document en entier *	1-4,7-34
A	EP-A-0 222 310 (THE WISTAR INSTITUTE)	
T	WO-A-94 28138 (UNIVERSITY COLLEGE LONDON) *le document en entier plus particulièrement les sequences ID. no 2 and 5 *	2,14,15
---		
-/--		
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
12 Mars 1996		Le Cornec, N
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul  Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie  A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général  O : divulgation non-écrite  P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention  E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.  D : cité dans la demande  L : cité pour d'autres raisons</p> <p>Δ : membre de la même famille, document correspondant</p>		

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE**  
établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

FA 510957  
FR 9414322

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	<p>NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 17, no. 15, 1989 OXFORD GB, pages 5913-5922, G. LA MANTIA ET AL 'Identification of new human repetitives sequences: Characterization of the corresponding cDNAs and their expression in embryonal carcinoma cells' * le document en entier *</p> <p>-----</p>	5,6
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL. 6)
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
12 Mars 1996		Le Cornec, N
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>----- Δ : membre de la même famille, document correspondant</p>		

3

EPO FORM 1503.03.92 (P04C13)